

# Målrettet antikreftbehandling med immuntoksin og småmolekylære TPM-derivater

Nusrat Haq Syeda



Tumorbiologisk Avdeling, Radiumhospitalet, Oslo  
Universitetssykehus og Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,  
Farmasøytisk Institutt, Universitet i Oslo

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

15.05.2011

## ***Forord***

Masteroppgaven ble utført ved Tumorbiologisk avdeling, på Radiumhospitalet, Oslo Universitetssykehus, i samarbeid med Universitet i Oslo i perioden august 2010 til mai 2011. Jeg vil først og fremst rette en stor takk til hovedveilederen min, Yvonne Andersson, for veiledning og konstruktive tilbakemeldinger. Din interesse for forskning er inspirerende og det har vært lærerikt å jobbe med deg.

En stor takk til biveileder Merete Wiiger, som alltid har hatt tid til å svare på mine endeløse spørsmål og med tålmodighet lært meg de ulike laboratorieteknikkene. Det hadde ikke vært mulig å fullføre denne oppgaven uten din enestående veiledning.

Jeg vil også takke til internveilederen min, Rigmor Solberg, for objektive og raske tilbakemeldinger.

Takk til alle på Tumorbiologisk avdeling for det gode arbeidsmiljøet. En spesiell takk til Ingrid Bettum for å ha kommet med kloke ord når jeg ikke har klart å se lyset i enden av tunnelen.

Denne masteroppgaven kunne ikke vært gjennomført uten støtte fra familie og venner. Jeg vil spesielt takke mine foreldre for oppmuntringen og troen på meg. Jeg hadde ikke oppnådd denne graden uten deres støtte.

Til slutt vil jeg takke Arif for å ha holdt ut med mitt master hysteri de siste månedene. Du har alltid vært interessert i å høre om immuntoksin, og oppmuntret meg når jeg har møtt utfordringer på veien.

Nusrat Haq Syeda, mai 2011.

# *Innholdsfortegnelse*

1. Ordforklaring.....	4
2. Sammendrag .....	7
3. Introduksjon.....	8
<b>3.1 Kreft</b> .....	8
3.1.1 Kreft i Norge.....	8
3.1.2 Brystkreft .....	9
3.1.3 Hormon negativ brystkreft.....	9
<b>3.2 Årsaker til kreft</b> .....	10
<b>3.3 Kreftbehandling</b> .....	11
<b>3.4 Celledød</b> .....	12
3.4.1 Apoptose .....	12
3.4.2 Nekrose .....	15
<b>3.5 Toksin</b> .....	15
<b>3.6 Immuntoksin</b> .....	16
<b>3.7 Trifenylnetyl-derivater (TPM-derivater)</b> .....	17
4. Mål.....	19
5. Materialer og metode .....	20
<b>5.1 Tining/dyrking av celler</b> .....	21
<b>5.2 Eksperimenter med celler</b> .....	22
<b>5.3 Høsting av celler til proteinlysate</b> .....	22
5.3.1 Proteinmåling .....	23
5.3.2 Gelelektroforese og immunblotting.....	24
<b>5.4 CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay</b> .....	25
<b>5.5 Proliferasjons assay med IncuCyte</b> .....	26

<b>5.6 ATP Bioluminescence Assay .....</b>	<b>26</b>
<b>5.7 Proteinsyntesehemming .....</b>	<b>27</b>
<b>5.8 TUNEL assay .....</b>	<b>28</b>
<b>5.9 Kvantitering av genuttrykk .....</b>	<b>30</b>
<b>5.10 In vitro klonal vekst assay .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Resultater .....</b>	<b>33</b>
<b>6.1 Behandling med immuntoksin gir nedgang i celleviabilitet og celleproliferasjon .....</b>	<b>33</b>
<b>6.2 Immuntoksin hemmer proteinsyntesen .....</b>	<b>37</b>
<b>6.3 Immuntoksin har effekt på eukaryotisk initieringsfaktor (eIF-2<math>\alpha</math>) .....</b>	<b>38</b>
<b>6.4 Behandling med MOC31PE påvirker ikke celsyklusen .....</b>	<b>40</b>
<b>6.5 Behandling med immuntoksin og ulike TPM-derivater viser synergisk cytotoxiskitet .....</b>	<b>42</b>
<b>6.6 Kombinasjonsbehandlingen immuntoksiner og TPM-derivater forandrer ATP-nivået i celler .....</b>	<b>48</b>
<b>6.7 Behandling med immuntoksin påvirker stearyl-Coenzym A desaturase 1 genuttrykket i MDA-MB-468 .....</b>	<b>50</b>
<b>6.8 MA11 og MDA-MB-468 gjennomgår apoptose etter behandling med immuntoksin og TPM-derivater .....</b>	<b>51</b>
<b>7. Diskusjon .....</b>	<b>61</b>
<b>8. Konklusjon .....</b>	<b>68</b>
<b>9. Videre planer .....</b>	<b>69</b>
<b>10. Referanser .....</b>	<b>70</b>
<b>11. Vedlegg .....</b>	<b>74</b>

## ***1. Ordforklaring***

### **Norsk/engelsk:**

$\Delta\Psi_m$ : mitochondrial membrane potential

AIF: Apoptosis-inducing factor

Apaf1: Apoptotic protease activation factor 1

ATP: Adenosine triphosphate

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BER: Base excision repair

BSA: Bovine serum albumin

CAD: Caspase activated DNase

CARD: Caspase recruitment domain

Caspase: Cysteiny aspartate-specific protease

dATP: Deoxy adenosine triphosphate

DISC: Death-inducing signaling complex

dNTP: Deoxynucleotide triphosphate

EF2: Elongation factor 2

eIF-2 $\alpha$ : eukaryotic Initiation Factor-2 $\alpha$

EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule

FADD: Fas-associated death domain

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FSC: Forward scatter

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HAMA: Human anti-murine antibody

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2

ICAD: Inhibitor of caspase activated DNase

IT: Immunotoxin

ITG-A2: Integrin alfa2

ITG-B1: Integrin beta1

KDEL: (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor

MOMP: Mitochondrial outer membrane permeabilization

MPT: Mitochondrial permeability transition

mRNA: Messenger ribonucleic acid

NAD: Nikotinamide adenine dinucleotide

NFκB: Nuclear factor kappa B

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

PBS: Phosphate-buffered saline

PE: Pseudomonas exotoxin A

PS: Phosphatidylserine

rtPCR: Real time polymerase chain reaction

SCD: Stearoyl-CoA desaturase

SSB: Single-strand breaks

SSC: Side scatter

TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase

TNBC: Triple-negative breast cancer

TPM: Triphenylmethyl

TPMP: Triphenylmethylphosphonate

TRADD: TNF-receptor-associated death domain protein

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand

VLS: Vascular leak syndrome

## ***2. Sammendrag***

Kreft er en sykdom som de fleste vil berøres av i løpet av livet, enten som pårørende eller som pasient. Kjentegnet for kreft er ukontrollert celledeling og spredning av kreftceller.

Brystkreft er den krefttypen som hyppigst rammer kvinner. Det finnes god behandling mot hormonreseptor-positive brystkreft i dag. Denne typen kreft kan man behandle kirurgisk, med antihormonbehandling og kjemoterapi. Behandlingsutfordringen ligger i tilbakefall av brystkrefttypen som ikke uttrykker hormonreseptorer. Ved trippel negativ brystkreft (TNBC) uttrykker ikke pasienter reseptorene for østrogen, progesteron og HER2/neu. Dette betyr at kreftcellenes vekst ikke er drevet av østrogen, progesteron eller av HER2/neu. Trippel negativ brystkreft vil derfor ikke respondere på antihormonterapi som tamoxifen eller medisiner som retter seg mot HER2 reseptorer (Herceptin). Disse egenskapene ved trippel negativ brystkreft gjør det ønskelig med nye terapimuligheter.

Det har tidligere blitt vist ved Tumorbiologisk avdeling på Radiumhospitalet at immuntoksin er et lovende terapeutikum som kan indusere celledød i brystkreftceller som MA11, ved å inhibere proteinsyntese og indusere apoptose. Med utgangspunkt i dette ble det i oppgaven undersøkt om immuntoksinet MOC31PE utøver like god effekt på TNBC-cellelinjen MDA-MB-468 som på brystkreftcellelinjen MA11. Disse cellelinjene uttrykker mye av antigen EpCAM som MOC31 antistoffet gjenkjenner. I tillegg har det også blitt undersøkt om den potensielle antikrefteffekten til trifenylmetyl (TPM)-derivater sammen med MOC31PE kan gi en synergistisk celledødseffekt i disse cellelinjene. Analysemetoder benyttet i denne oppgaven har vært proteinsyntesehemming, celleviabilitets assay, immunblott, TUNEL-assay, ATP-assay, RT-PCR og klonal vekst-assay. Disse metodene ble valgt etter diskusjon med prosjektgruppen med tanke på den kjente virkningsmekanismen til immuntoksin.

Det ble bekreftet proteinsyntesehemming og apoptose i MA11 og MDA-MB-468 etter behandling med MOC31PE og TPM-derivater. En synergistisk cytotoksisk effekt ble også observert. Disse resultatene er i tråd med vår hypotese om den proteinsyntesehemmende og apoptoseinduserende effekten til immuntoksinet.



### **3. Introduksjon**

#### **3.1 Kreft**

Kreft (malign neoplasma) er en gruppe sykdommer som kjennetegnes av ukontrollert cellevekst, invasjon til nærliggende vev, og av og til spredning (metastasing) av kreftceller gjennom blodet eller lymfen [1]. Disse tre egenskapene skiller ondartet (malign) tumor fra godartet (benign) tumor, som ikke invaderer eller metastaserer.

Kreft kan deles i ulike kategorier. Hovedtypene er [2]:

- *Karsinoma*: kreft som har utgangspunkt i huden eller i vev som omringer epitelceller.
- *Sarkoma*: kreft som har utgangspunkt i ben, brusk, fett, muskel, blodkar eller andre bindevev.
- *Leukemi*: kreft som har utgangspunkt i bloddannede vev som beinmargen.
- *Lymfoma og myeloma*: kreft som har utgangspunkt i immunsystemet, der B- og T-celler berøres.
- *Kreft i sentral nervesystemet*: kreft som har utgangspunkt i hjernen og ryggvirvel.

For at de ulike organene i kroppen skal kunne erstatte gamle celler, må nye celler produseres kontinuerlig. Når normale celler deler seg, er cellyklusen kontrollert i flere cellykluspunkter som er grunnlaget for kontrollert celledeling. En kreftcelle har evnen til å dele seg kontinuerlig som et resultat av en rekke genetiske feil (blant annet mutasjoner) i gener som kontrollerer celledelingen. Disse kreftcellene vil ikke ha de samme egenskapene som de utgangscellene de prolifererte fra. Dette kan resultere i ukontrollert proliferering av kreftceller som kan gi svulstdannelse.

##### **3.1.1 Kreft i Norge**

Etter hjerte- og karsykdommer er kreft den vanligste dødsårsaken i Norge, og det er om lag én av fire som dør av kreft [3]. Forventet antall krefttilfeller kommer til å øke med om lag 30 % frem mot 2020, og nesten 31 000 vil få en kreftdiagnose dette året i Norge. I 2008 ble 26 121 mennesker diagnostisert med kreft. Den vanligste kreftformen som rammer menn er prostatakreft,

og det var 4168 nye tilfeller i 2008. Brystkreft er den vanligste kreftformen hos kvinner og det var 2753 nye tilfeller i 2008. Det er spesielt eldre som rammes av kreft, og i Norge er de fleste som får en kreftdiagnose over 50 år [1].

### 3.1.2 Brystkreft

Brystkreft referer til malign tumor som har sin opprinnelse i brystkjertelvevet. Brystvevet er bygd opp av kjertelvev, fettvev og bindevev. Melkekjertlene har forgreininger som ender i brystvorten, og disse forgreiningene kalles melkeganger. Det er i melkegangene rundt 80 % av brystkrefttilfellene oppstår, mens 10-15 % av krefttilfellene oppstår i melkekjertlene [4].

Det er usikkerheter rundt årsaker til brystkreft. Halvparten av de som diagnostiseres med brystkreft, har utviklet sykdommen på grunn av alder eller kjønn. De andre faktorene som kan bidra til utvikling av kreft er [5]:

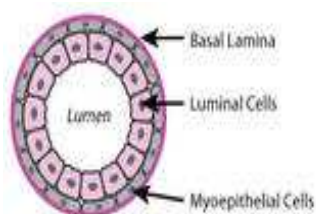
- *Arv*: hvis brystkreft finnes i en førstegradsslektning, vil risikoen for å utvikle brystkreft øke 3-4 ganger. Det er vanlig at unge jenter som får brystkreft, blir undersøkt for mutasjoner i genfamiliene BRCA1 og BRCA2, som er tumorsuppressorgener og er involvert i kreftutvikling
- *Hormonelle årsaker*: flere hormonelle forhold øker risikoen for brystkreft som menstruasjon i tidlig alder og/eller om overgangsalderen kommer sent, å føde første barnet etter 30 års alderen og hormonerstatningsbehandling etter overgangsalderen.

### 3.1.3 Hormon negativ brystkreft

Trippelnegativ brystkreft er vanligst hos unge kvinner, spesielt hos afroamerikanske kvinner [6], og rundt 10-15 % av brystkrefttilfeller er av trippelnegativ typen [7]. Pasienter diagnostisert med denne type kreftform har større sjanse for tilbakefall enn de som er diagnostisert med hormonpositiv brystkreft [8]. Brystkrefttypen responderer godt på konvensjonell kjemoterapibehandling ved førstegangsdiagnose. Ved tilbakefall er behandlingsalternativene få, og det forskes på å finne behandlingsalternativ ved tilbakefall. Det har vist seg at brystkreft med ``basal-like`` karakter er mer aggressiv i sykdomsutviklingen. Trippelnegativ brystkreft har også

blitt kategorisert under ``basal-like`` brystkreft type, og utgjør omtrent 80 % av ``basal-like`` tumorer [7].

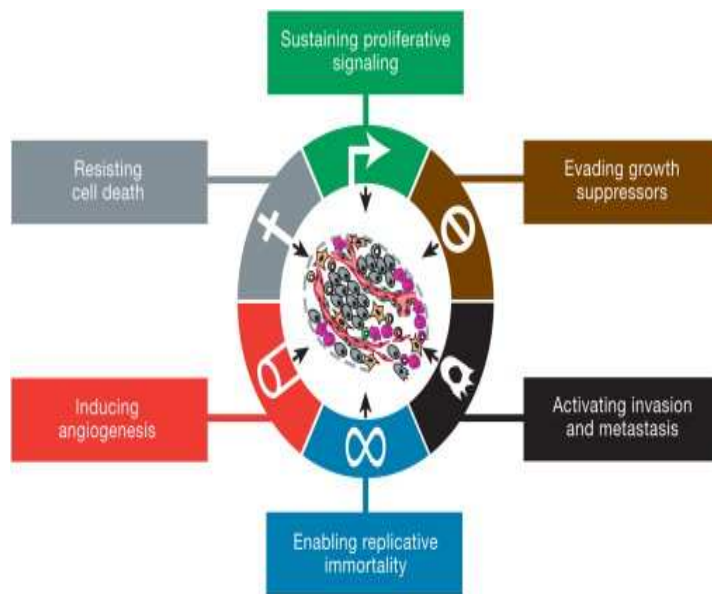
Brystvevet består av to ulike lag med celler, et lag med ytre basalceller og et lag med indre luminalceller (figur 1). Basaldelen består i hovedsak av differensierte celler. Luminaldelen består av differensierte celler og flere typer av celler som er intermediater mellom luminal celler og stamceller. I de fleste tilfeller har de såkalte ``basal-like`` kreftcellene sin opprinnelse i disse intermediate cellene [9].



*Figur 3.1: Bilde av oppbygging av brystvevet i basal luminal celler, luminal celler og myoepitel.*

### 3.2 Årsaker til kreft

Det finnes over 100 ulike krefttyper, og de klassifiseres etter utgangscellen der kreften hadde sin opprinnelse. Årsaker til kreft kan være miljøpåvirkning, arv, genetiske forandringer, livsstil og andre karsinogenetiske faktorer. Eksempel på ytre påvirkning som kan føre til kreft er ioniserende stråling, sigaretttrøyk, virus og kjemiske substanser. Indre påvirkning kan være genetisk disposisjon [1]. Det har blitt foreslått seks essensielle endringer i cellefysiologien som kan bidra til kreftutvikling (Figur 2); opprettholdelse av proliferativ signalering, unngå veksthemmere, aktivering av invasjon og metastase, ubegrenset potensial til replikasjon, induert angiogenese og redusert celledød [10].



Bilde kopiert fra [10].

*Figur 3.2: De seks essensielle endringer i cellefysiologi som kan bidra til kreftutvikling.*

### 3.3 Kreftbehandling

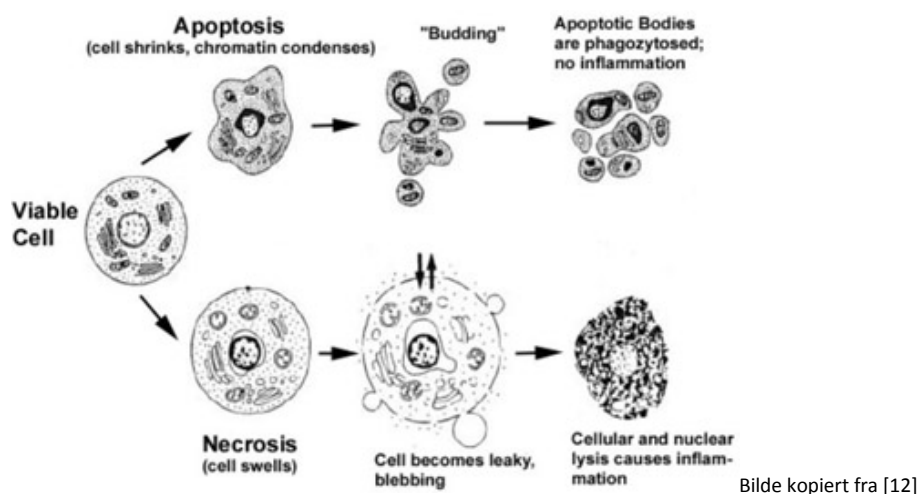
Det finnes ulike kreftbehandlinger, og valget av behandling vil være basert på prognosen, målet med behandling og krefttype. Ved benign tumor er det ofte tilstrekkelig med kirurgisk behandling. Malign tumor og spredning må behandles med en kombinasjon av behandlinger som cellegift, strålebehandling, kirurgi og/eller biologisk behandling/måltrettet behandling.

De fleste cellegiftene angriper DNA og hindrer dermed nysyntese av DNA. Behandlingen er spesielt effektive mot hurtigvoksende celler. Cellegift kan i tillegg til å være hovedbehandling, også gis som tilleggsbehandling (adjuvant behandling). Da gis det etter en operasjon eller strålebehandling for å drepe eventuelle gjenværende kreftceller.

Strålebehandling er en effektiv behandlingsmåte som kan helbrede (kurativ behandling), lindre symptomer eller gi livsforlengelse (palliativ behandling). I metoden brukes ioniserende stråling som skader kreftceller og kan gis sammen med kjemoterapi, kirurgi eller andre former for kreftbehandling. Strålingen skader DNA ved å danne frie radikaler som skader dobbeltrådene i DNA, noe som medfører saktere celleproliferasjon eller celledød [2].

### 3.4 Celledød

Celledød er essensiell for utviklingen av alle flercellede organismer. En celle kan dø på flere måter, og de ulike mekanismene klassifiseres etter ulike kriterier; morfologiske-, enzymologiske-, funksjonelle- eller immunologiske karakterer [11]. I oppgaven har hovedsakelig ulike apoptose markører blitt undersøkt (Figur 3.3).



Figur 3.3: Morfologiske endringer i cellen assosiert med apoptose og nekrose.

#### 3.4.1 Apoptose

Ordet *apoptose* kommer fra gresk og betyr ``å falle av eller droppe av``, som indikerer blader som faller fra et tre. Apoptose er en fysiologisk prosess som er viktig i embryologisk utvikling og for homeostase [12]. Prosessen skilles fra andre celledødsprosesser ved ulike morfologiske karakterer: cellen skrumper inn, membranutbukning, cytoplasma skrumper og det dannes ``apoptotic bodies`` (Figur 3.3, øverst). Disse hendelsene fører til at fosfatidylserin (PS), som eksponeres i celleoverflaten når celler gjennomgår apoptose, sender signaler til makrofager som så fagocytterer de døende cellene [13]. Termen programmert celledød ble introdusert i 1964 hvor det ble foreslått at apoptose er en sekvens av hendelser som er kontrollert og som tilslutt fører til celledød [14].

Innen kreftforskningen har man mye fokus på apoptose og hvordan kreftutviklingen påvirkes av denne prosessen. Ikke bare er apoptose viktig i kreftutviklingen, men det vil også påvirke behandlingsalternativene. De tumorene som er resistente mot apoptose, betraktes som vanskelig å behandle. Dagens antikreftterapi har programmert celledød som behandlingsmål, og det forskes på nye legemidler som kan indusere apoptose hos kreftceller.

Apoptose kan forårsakes av mange ulike signaler, som for eksempel intracellulær stress, mangel på vekstfaktorer, binding av dødsligander og DNA-skader. Apoptose kan initieres via ytre eller indre vei avhengig av årsaken [13].

### ***Indre signalvei:***

Den indre signalveien kan initieres når celler blir utsatt for intracellulært stress som påvirker mitokondrielle ytre membranpermeabilisering (MOMP). Membranpermeabiliseringen er nøye regulert av proteinfamilien Bcl-2.

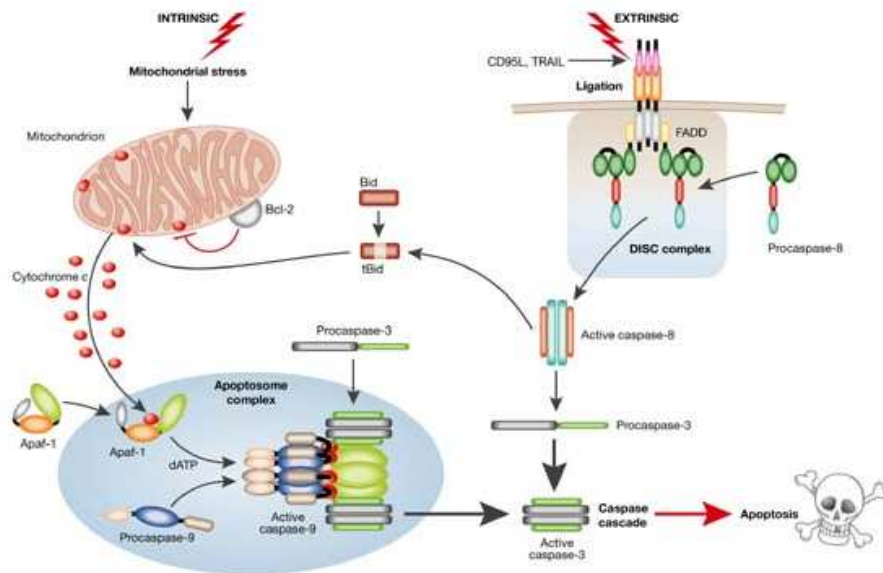
Mitokondrier er celleorganeller som forsyner celler med energi (ATP), som celler blant annet bruker til celledeling, bevegelse, proteinsyntese og opprettholdelse av membranpotensialet [15]. Mitokondriene har en ytre membran som er separert fra en indre membran med en intermembranområde (cristae). Det er i mitokondriene celleprosesser som sitronsyresyklus, fettsyreoksidasjon, respirasjonskjede og oksidativ fosforylering finner sted.

Det intermembrane området inneholder mange proteiner som er involvert i apoptose, som for eksempel cytokrom c, AIF, Omi/HtrA2 og Smac/DIABLO. Når celler utsettes for ulike stimuli som påvirker den indre mitokondriemembranen, vil det dannes en åpning i mitokondriell permeabilitet transisjonspore (MPT). Det mitokondrielt membranpotensialet ( $\Delta\Psi_m$ ) reduseres og proapoptotiske proteiner som cytokrom c frigjøres til cytoplasma [16] (Figur 3.4). Ulike proteaser/caspaser som caspase-3 aktiveres og kløyver PARP, som ikke lenger klarer å reparere DNA skade [17].

### ***Ytre signalvei:***

Apoptose kan også initieres når celler mottar ekstracellulære signaler. Dødsligander (som TRAIL og TNF $\alpha$ ) kan binde seg til reseptorer på celleoverflater og aktivere dem (Figur 3.4). Aktiverte

dødsreseptorer vil samle seg, rekruttere adapterproteiner (som FADD og TRADD) sammen med procaspase-8 og/eller 10 og danne Death Inducing Signaling Complex (DISC) [18]. Aktiverte caspase-8 og/eller 10 kan så aktivere caspase-3.



Bilde kopier fra[19]

Figur 3.4: På bildet vises de ulike veiene en celle kan dø på som følge av apoptose.

PARP:

PARP er et protein som er involvert i ulike celleprosesser som DNA-reparasjon og programmert celledød. PARP binder seg til skadet DNA-tråd og gjennomgår automodifikasjoner som fører til at det dannes lange poly(ADP-ribose) polymerer på PARP-proteinet. Resultatet er et negativt ladet PARP som dissosieres fra DNA-ender og bidrar til DNA reparasjon [20]. Evnen til å reparere DNA-skader blir hindret når PARP kløyves av aktivt caspase-3. Fragmentering av DNA forårsakes av enzymet caspase-aktivert DNAase (CAD). Hos normale celler vil CAD befinne seg i et inaktivt kompleks med hemmer av CAD (ICAD). ICAD kløyves av caspase-3 under apoptose slik at CAD frigjøres [18].

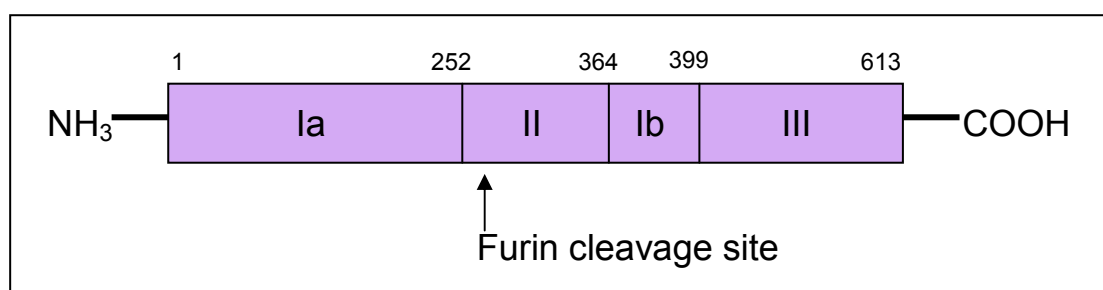
### 3.4.2 Nekrose

Celler kan dø på grunn av *nekrose* som betyr ``å være død`` på gresk. Nekrose er ofte assosiert med inflammasjonsrespons fra nærliggende vev som følge av frigjørelse av intracellulært materiale. Nekrose er en respons på ytre faktorer celler og vev utsettes for, som for eksempel toksiner, infeksjoner og traumer.

De morfologiske forandringene ved nekrose kan være oppsvulming av cellen, tap av membranintegritet [21]. En respons på dette er lekkasje av intracellulært materiale til omgivelsen.

### 3.5 Toksin

Toksiner kan utvinnes fra planter og bakterier. I denne oppgaven har bakterietoksinet *Pseudomonas exotoxin A (PE)* blitt brukt. Dette er den mest toksiske substansen fra bakterien *Pseudomonas aeruginosa* [22]. Proteinet har tre ulike domener; et cellebindende domene (domene Ia), et translokasjonsdomene (domene II) og et aktivt domene (domene III) (Figur 3.5). Det er det aktive domenet som forårsaker ADP-ribosylering av elongeringsfaktor 2 (EF2) og dermed hemmer proteinsyntesen [23] (Figur 3.6). Det er en modifisert histidin aminosyre (diflamid) i EF2 proteinet som er det spesifikke målet for PE. Diflamid er bare funnet i EF2-proteiner [24].



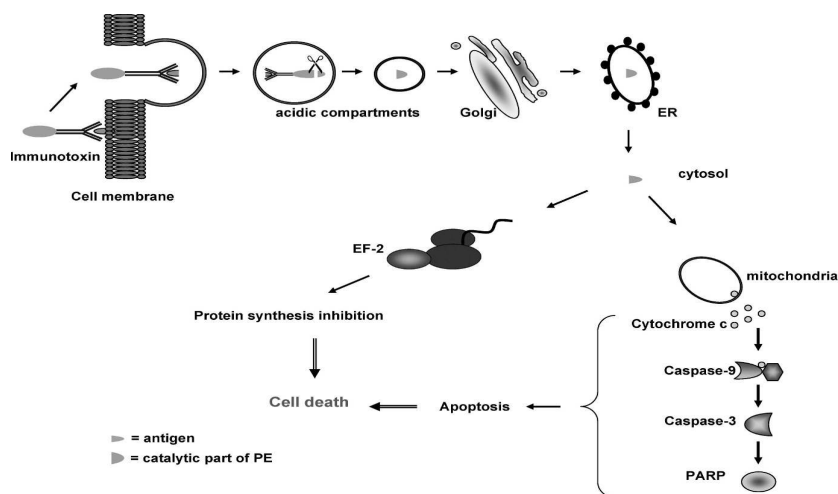
Figur 3.5: *Pseudomonas exotoxin A (PE)* er et enkelkjedet protein med tre funksjonelle domener (I-III).



### 3.6 Immuntoksin

For å bruke immuntoksin til kreftbehandling er det kreftcellespesifikke antistoffet bundet til et toksin. Antistoffet binder seg til sitt spesifikke antigen, og toksinet føres inn i cellen der det hemmer proteinsyntesen og induserer apoptose direkte [25] (Figur 3.6). Det er mange fordeler med immuntoksin kontra tradisjonell kreftbehandling som for eksempel kjemoterapi og strålebehandling, da immuntoksin:

- Er spesifikk for kreftcellene slik at normale celler ikke angripes. På den måten unngås bivirkninger av kjemoterapi og strålebehandling grunnet uspesifisitet som forårsaker skade på normale celler.
- Dreper både hvilende og prolifererende kreftceller i motsetning til tradisjonell kreftbehandling som ikke virker på hvilende kreftcellene.
- Dreper apoptoseresistente celler som har blitt resistente mot kjemoterapi og strålebehandling.



Bilde kopiert fra [26]

*Figur 3.6: Immuntoksiner går inn i cellen via endocytose. I lysosomer blir det aktivert ved å bli spaltet av enzymet furin. Det kløyvde fragmentet kan hemme proteinsyntesen i*

*cytosol, eller direkte forårsake apoptose ved å endre på mitokondrielt membranpotensialet [27].*

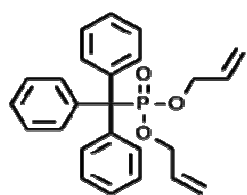
Etter at immuntoksinet binder seg, internaliseres det via endocytose inn i cellen. Immuntoksinets spesifisitet bidrar til at friske celler ikke blir angrepet. I cytosol vil immuntoksinet inhibere proteinsyntesen. Ett immuntoksin molekyl er nok til å drepe en celle, noe som gjør immuntoksin et av mest potente celledrepende agensene [28].

Gruppen vår, med Yvonne Andersson som gruppeleder, har lang erfaring med ulike immuntoksiner som gjenkjenner antigener som er spesifikt uttrykt på kreftceller. Tumorbiologisk avdeling har forsket på immuntoksin i mer enn 30 år og har publisert mange artikler med lovende data om immuntoksiners evne som antikreft agens. Immuntoksinene har blitt utprøvd *in vitro* og i dyremodeller med tumor. *In vivo* studiene har vist at tumorveksten og metastasering blir redusert ved behandling med immuntoksiner, og at de har lav bivirkningsprofil. Immuntoksinet MOC31PE er i klinisk fase I utprøvning. Antistoffet MOC31 gjenkjenner epitelcelle adhesjonsmolekyl (EpCAM) [29], som er et hyppig uttrykt antigen på mange epitelkarsinomer som brystkreft [30].

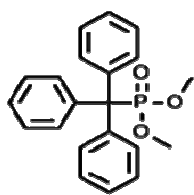
### **3.7 Trifenylmetyl-derivater (TPM-derivater)**

TPM-derivater har vist seg å være effektive antikreft agens [31]. Trifenylmetylfosfonater (TPMP) er en gruppe TPM-derivater [31], og disse har blitt benyttet i oppgaven. Det har tidligere blitt vist at ulike TPM-derivater gir veksthemming ved G<sub>1</sub>-fasen i cellesyklusen, reduserer cellulære nivåer av NFκB og induserer apoptose. Samtidig har det blitt vist at medikamentene er godt tolerert og har lav toksisitet i normale celler [31]. Vi har nylig påvist en synergistisk økning i celledød med to ulike TPM-derivater i kombinasjon med immuntoksin i ulike cancercelletyper som bryst og malign melanom (Risberg et al, 2011 Journal of Immunotherapy (in press)).

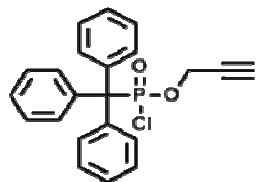
I denne oppgaven har det blitt benyttet TPMP med ulike sidekjeder, og de ulike gruppene er; TPMP I-2 (VN12), TPMP I-10, TPMP II-2, TPMP III-2 og TPMP III-10 (Figur 3.7).



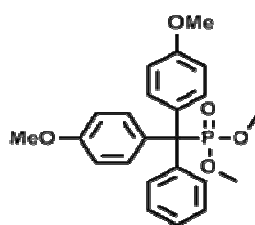
TPMP-I-10



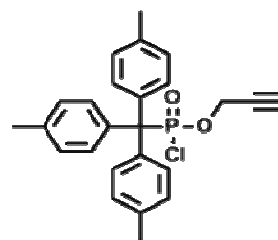
TPMP-I-2



TPMP-II-2



TPMP-III-2



TPMP-III-10

Figur 3.7: Kjemiske formel for de TPM-derivatene benyttet i oppgaven.

#### **4. Mål**

Immuntoksin består av et toksin og et kreftspesifikt antistoff slik at de kun angriper kreftceller og ikke friske celler. Kreftcellene vil dø på grunn av proteinsyntesehemming, og indusert apoptose. De målrettede egenskapene til immuntoksiner kan bidra til at kreftpasienter opplever mindre bivirkninger sammenlignet med konvensjonell kreftbehandling.

Trippelnegativ brystkreft er vanskelig å behandle ved tilbakefall på grunn av at kreftcellene ikke responderer på antihormonbehandling. Krefttypen anses som aggressiv og invasiv ved tilbakefall, som er mye vanligere for denne krefttypen enn for antihormon responsiv brystkreft. Det er derfor ønskelig å finne målrettede behandlinger for slike krefttyper når det ikke finnes noen andre behandlingsalternativer. Cellelinjen MDA-MB-468 ble isolert fra en trippelnegativ brystkreftpasient, og er benyttet i denne oppgaven for å studere effekten av immuntoksin på trippelnegativ brystkreft. Dobbelnegativ brystkreft, som ikke uttrykker gener for østrogen og progesteron reseptor møter også lignende behandlingsproblemer som trippelnegativ brystkreft. Cellelinjen MA11 er fra en dobbelnegativ brystkreftpasient, og det har blitt gjort mye forskning på cellelinjen i gruppen vår med lovende resultater. For å studere videre, og som referanse, har cellelinjen MA11 blitt benyttet i denne oppgaven.

Følgende mål kan defineres:

- Studere effekten av immuntoksinet MOC31PE på kreftcellelinjene MA11 og MDA-MB-468.
- Studere effekten av TPM-derivater.
- Kombinere immuntoksiner og TPM-derivater for å evaluere synergistisk cytotoxiskitet.

## 5. Materialer og metode

For å dyrke celler *in vitro*, må noen betingelser være oppfylt. Miljøet må være så lik *in vivo* betingelser som mulig. Det er da viktig å tenke på temperatur, vekstfaktorer i mediet, CO<sub>2</sub> og ulike næringsstoffer. For at celler ikke skal vokse for tette, må cellekulturen splittes med jevne mellomrom.

De humane brystkreftcellelinjene MDA-MB-468 og MA11 har blitt brukt i forsøkene i denne oppgaven. Alle oppsettene ble gjentatt minst to ganger for å standardisere forsøkene.

Cellelinjen MDA-MB-468 ble isolert av (R. Cailleau, et al, 1977) fra pleural effusjon hos en 51 år gammel kvinne med afrikansk opprinnelse som hadde metastatisk adenokarsinom. Cellelinjen er kjøpt fra ATCC [32] og har tumorgeniske egenskaper som betyr at cellen kan gi opphav til tumor i dyremodeller.

MA11 cellelinjen ble isolert fra beinmargen til en brystkreft pasient [33] Cellene metastaserer selektivt til hjernen hos atymiske mus (mutert mus som har fått eliminert tymus) [33]. Cellelinjen har også ulike kromosomale rearrangementer som gjør cellelinjen egnet som brystkreft modell [34].

MDA-MB-468 ble dyrket i Leibovitz's medium med 10 % føtal bovin serum og glutamax. Cellene ble dyrket ved 37 °C uten tilsetning av CO<sub>2</sub>.

MA11 ble dyrket i RPMI-1640 medium med 10 % føtal bovin serum, glutamax og Hepes. Hepes ble tilsatt som en buffer mot CO<sub>2</sub> og H<sub>2</sub>O reaksjonen som finner sted i CO<sub>2</sub> inkubatoren der MA11 celler ble dyrket. CO<sub>2</sub> og H<sub>2</sub>O reagerer etter følgende reaksjon:



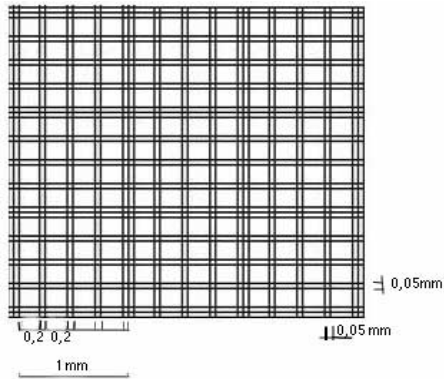
Hepes er en zwitterionisk buffer som bufrer mediet slik at pH verdien holdes stabil og på fysiologisk nivå.

## 5.1 Tining/dyrking av celler

All celledyrking foregikk i sterilt miljø i laminal air flow (LAF) benk. Medium og trypsin-EDTA som ble tilsatt cellekulturene, ble forvarmet til 37 °C i vannbad. Benken og usterilt utstyr ble desinfisert med 70 % metanol før bruk.

Cellene ble splittet 2-3 ganger i uken når de var 70-90 % konfluente. For å splitte celler ble det gamle mediet i celledyrkingsflasken sugd av og kastet. Dette steget er nødvendig for å fjerne løse og skadede celler som flyter i mediet. Medierester i flasken ble så skylt bort med trypsin-EDTA for å unngå at trypsininhibitor i medierestene inhiberer trypsinet. Trypsin er en serinprotease som vil løsne adherente celler fra cellekulturflasker ved å kløve peptidbindinger mellom celleoverflaten og dyrkingsflasken. For at cellene skulle løsne ble de inkubert ved 37 °C i omtrent 5 minutter. De løse cellene ble så resuspendert i medium. Volumet var avhengig av hvilke splittingsfaktor som de ble splittet med. Celledyrkingsflasker var i størrelsesorden T25 eller T75, avhengig av forsøksoppsettet.

Hvis cellene skulle brukes til forsøk, ble de først telt i et Bürkerkammer (figur 5.1), og så fortynnet til ønsket volum. Et Bürkerkammer består av en glassplate med to definerte områder på 9 mm<sup>2</sup>, avgrenset av 3 parallelle linjer. Dette området er dekket av et dekkglass, slik at dybden blir 0,1 mm. Telleområdene er videre delt inn i 9 like store kvadrater, hvert 1 mm<sup>2</sup>, som igjen er delt inn i 16 like store kvadrater. Omtrent 20 µl celsuspensjon ble pipettert til et Bürkerkammer og celsuspensjonen trekkes inn i kammeret ved hjelp av kapillærkrefter. Selve tellingen gjøres ved å telle antall celler i et 1 mm<sup>2</sup> kvadrat, fordelt på 16 små hjelpekvadrater. Dette repeteres 3 ganger og gjennomsnittet beregnes. Et areal på 1mm<sup>2</sup> og dybde på 0,1 mm gir et volum på 0,1 mm<sup>3</sup>, som tilsvarer  $1 \cdot 10^{-4}$  ml. For å finne antall celler per ml, multipliseres gjennomsnittet telt celler med  $10^4$ .



Figur 5.1: Bürkerkammer. Alle målene er angitt i mm.

## 5.2 Eksperimenter med celler

Før cellene ble behandlet, ble de sådd ut i ønsket mengde i tilpassede celledyrkings flasker eller brønner og fikk vokse i 24 timer til de nådde 70-80 % konfluens. For å standardisere forsøkene, ble det tatt med ubehandlede kontroll kulturer. Disse cellene ble sådd ut i samme mengde som de cellene som skulle behandles med immuntoksin og/eller TPM-derivater.

Cellene ble behandlet med MOC31PE i ulike konsentrasjoner (0,01ng/ml, 0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml og 100ng/ml). I tillegg ble cellene behandlet med TPMP III-10, TPMP III-2, TPMP II-2 og TPMP I-10. Konsentrasjonene var 0,1μM, 1 μM, 10μM og 50μM. MOC31PE var løst i PBS med 0,1 % HSA. Tørrstoffet TPMP ble løst i metanol til sluttkonsentrasjon på 10 mM. De ønskede konsentrasjonene ble laget ved å ta fra TPMP stock løsning og fortynnet i ønsket mengde med medium (RPMI eller Leibovitz's).

## 5.3 Høsting av celler til proteinlysats

Etter at cellene var behandlet med ønsket mengde immuntoksin og/eller TPMP i T25 flasker (nunc) i 24 timer, ble de høstet til proteinlysats. For å tilberede lysats ble cellemediet først helt i et 50 ml rør (Falcon) for å få med celler som hadde løsnet på grunn av behandlingen. Så ble medierester i flasken skylt bort med litt trypsin-EDTA, og 1 ml ny trypsin-EDTA tilsatt. Flaskene ble inkubert ved 37 °C i 5 minutter til cellene hadde løsnet. For å være sikker på at alle cellene var løsnet, ble det forsiktig kakkert på flasken etter inkuberingen. Trypsin-EDTA løsningen med løse cellene ble så helt i 50 ml røret. 10 ml kald PBS ble så tilsatt til flasken. PBS brukes for å

vaske cellene fordi PBS har en pH som er tilnærmet lik pH i kroppen vår, den er isoton og ikke-toksisk slik at den ikke skader cellene under vaskeprosessen. Løsningen ble så sentrifugert i 5 minutter ved 1000 rpm (rotations per minute). Etter sentrifugeringen ble supernatanten helt av, 20 ml PBS ble brukt for å løse opp cellepelleten og sentrifugeprosessen ble gjentatt. Supernatanten ble så sugd av og cellepelleten ble løst i 1 ml PBS og løsningen ble overført til et eppendorfrør. Celleløsningen ble sentrifugert i 5 minutter ved 13000 rpm ved 4 °C. Denne prosessen ble repetert 2 ganger. Rester av PBS ble sugd av, og cellepelleten ble raskt sentrifugert i en bordsentrifuge for å fjerne rester av PBS. Cellepelleten ble så raskt nedfrosset i flytende nitrogen og ble oppbevart i fryser.

Tint cellepellet ble resuspendert i 150 – 200 µl (avhenging av pellet størrelsen, jo mindre pellet, jo mindre volum løsning) kokende lyseringsløsning og blandet godt. Lyseringsløsningen inneholder deionisert vann, Tris buffer med pH 7.5, sodium dodecyl sulphate (SDS) og natriumvanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). SDS virker som en detergent og kan åpne cellemembranen i vandig løsning, og fører til at celleinnhold kommer ut av cellen i løsningen. Natriumvanadate er en fosfatase hemmer og målet er å opprettholde fosforyleringen av celleproteiner. Celleblandingen ble så kokt ved 100 °C i 5 minutter, og prøven ble sugd opp og ned for å kutte opp DNA gjennom en sprøytespiss (25G 0.5X16mm). Prøven ble så sentrifugert i 7 minutter ved 13000 rpm ved 4 °C. Supernatanten som inneholder proteiner, og er uten celledetritus og DNA fragmenter, ble pipettert over i et nytt eppendorfrør.

### 5.3.1 Proteinmåling

Bicinchoninic syre-assay (BCA) ble brukt for å kvantitere total proteinkonsentrasjon ved hjelp av kolorimetri. Aminosyrene cystein, tryptofan og tyrosin, samt peptidbindinger i proteiner reduserer kobberioner fra  $\text{Cu}^{2+}$  til  $\text{Cu}^{1+}$  i alkalisk miljø. Mengden  $\text{Cu}^{1+}$  detekteres av BCA (Bicinchoninic syre-assay). Komplekset BCA/kopper har en lineær absorbans ved 562 nm, og øker tilnærmet proporsjonalt med proteinkonsentrasjon.

3 µl av proteinløsningen ble tilsatt i et 96 brønners brett (Nunc) i tripletter. For å eliminere egensignalet til lyseringsbufferet i prøven, ble 3 µl av lyseringsbuffer tilsatt i dubletter. For å bestemme proteinkonsentrasjonen, ble det satt opp en standardkurve med kjente konsentrasjoner



av proteinet bovin serum albumin (BSA). 250 µl BCA løsning ble så tilsatt alle prøvene og prøvene ble inkubert i 30 minutter ved 37 °C i en inkubator. Før prøven ble avlest, ble platen avkjølt til romtemperatur. Absorbansen ble målt ved 560 nm i Modulus Microplate avleser.

### 5.3.2 Gelelektroforese og immunblotting

Western blot er en analytisk metode for å detektere spesifikke proteiner. Metoden ble benyttet i denne oppgaven for å kunne kartlegge hvilke proteiner som er involvert i celledød. I metoden blir proteiner separert etter størrelse ved hjelp av gelelektroforese i en polyacrylamid gel. Deretter overføres de separerte proteinene til en polyvinyl fluorid (PVDF) membran. Membranen blir så probet med primært og sekundært antistoff for at ønskede proteiner skal kunne detekteres.

Like mye proteinlysate fra hver prøve ble blandet med 15 µl loading buffer, og tilsatt vann til en total volum på 45 µl. Loading bufferen inneholder Reducing Agent (10X) i forholdet 1:10. Reduserende agenten hjelper til med å løse opp disulfidbroer i proteinprøven slik at vi ikke har noen sekundære eller tertiære proteinstrukturer. Før prøven ble applisert til gelbrønner, ble proteinene denaturert ved å varme prøvene ved 100 °C i 5 minutter. SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Prestained Standard (1X) ble brukt som standard. Dette er en farget molekylær vekt standard som gir bånd med spesifikke molekylvekter, slik at man kan sammenligne molekylvekten til sine bånd med standardene.

SDS gel ble kjørt i 90 minutter ved 150V/200mA i MES buffer (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, 4-Morpholineethanesulfonic acid). Denne bufferen egner seg når man vil separere molekyler med molekylvekt fra omtrent 70-100 kDa og nedover. SDS gir proteinene en negativ ladning, og dermed vandrer de mot den positivt ladede elektroden. Små proteiner vil lettere vandre mellom porene i gelen, og vandre lengst mot positive polen. De større proteinene vil møte mer motstand i gelen, og vil dermed vandre kortere. Ut i fra deres størrelse vil de samle seg på ulike steder i membranen.

De separerte proteinene i gelen ble overført til en PVDF-membran som var aktivert i metanol. PVDF membranen er hydrofob, og for at membranen skal binde proteiner må den aktiveres. Blottingen ble kjørt i 90 minutter ved 30V/300mA i 1X transfer buffer (transfer buffer hjelper til med å lede elektrisitet samt holde en konstant pH verdi). Kaldt deionisert vann ble tilsatt i det

andre kammeret i immunblott utstyr for å holde blottingen kaldt slik at gelen og proteinene ikke ødelegges av varmen. Membranen ble plassert slik at negativt ladede proteinene kunne blottes fra gelen og over i membranen. For å kontrollere jevn proteinoverføring, ble membranens farget med en amido black løsning som spesifikt farger proteiner.

For at våre antistoffer ikke skulle bindes uspesifikt til membranens, ble den blokkert i TBST buffer med 5 % w/v tørrmelk (TBST sammensetningen avhengig av primær antistoffet som ble brukt). Membranen ble så tilsatt primært antistoff løst i TBST buffer med enten oppløst tørrmelk eller BSA og probet ved 4 °C over natt. Neste dag ble membranens vasket 3 ganger 10 minutter i TBST buffer, og så tilsatt et HRP-linket (Horseradish peroksidase) sekundært antistoff. Hybridiseringen foregikk i 1 time ved romtemperatur. Vaskeprosedyren ble gjentatt med TBST buffer. For å detektere proteinene, ble membranens tilsatt et luminiscens substrat. Substratet interagerer med HRP i sekundært antistoff, og peroksidase aktiviteten gir luminiscens som kan detekteres på røntgen film som så kan fremkalles.

#### **5.4 CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay**

MTS assay er et kolorimetrisk assay der antall levende celler blir målt etter fargeintensitet. MTS løsningen består av tetrazolium komponent [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] og et elektron koblende komponent (phenazine methosulfate) PMS. MTS blir redusert av levende celler til formazan i nærvær av PMS, som reduseres av NADH. Mengden formazan kan måles ved 490nm i en 96 brønners brett og er direkte proporsjonal med antall levende celler.

MA11 celler ble behandlet i 96 brønners brett (Costar) med ønskede konsentrasjoner av immuntoksin og/eller TPMP i 24 timer, og det var sådd ut 7500 celler/brønn. For å subtrahere signalet fra RPMI-1640 medium i prøvene, ble medium tilsatt til brønner uten celler i platen. Ved avslutning av eksperimentet ble 10 µl MTS løsning applisert til hver brønn, og ble inkubert ved 37 °C i inkubator i 1-3 timer. Deretter ble absorbansen målt ved 490 nm.

## 5.5 Proliferasjons assay med IncuCyte

IncuCyte er en maskin som settes inn i en CO<sub>2</sub> inkubator og består av et mikroskop med kamera og brett til celleflasker/dyrkingsbrett. Maskinen benyttes til ``live cell imaging`` av celler. Det gir mulighet til å dokumentere endringer i cellulær vekst, oppførsel og morfologi etter behandling med cytotoksiske legemidler gjennom flere tidsintervaller [35].



Figur 5.2: IncuCyte maskin i en CO<sub>2</sub> inkubator.

MDA-MB-468 og MA11 celler ble sådd ut i 96 brønners brett (Costar) med 10 000 celler/brønn. Etter at de hadde prolifert i 24 timer, ble cellene behandlet med MOC31PE/TPM-derivater. Brettet ble så satt inn i IncuCyte maskinen og ble inkubert i ønsket antall timer. Resultatene ble presentert som proliferasjonsgrafer og bilder av bestemte brønner.

## 5.6 ATP Bioluminescence Assay

ATP (adenosintrifosfat) er en markør for celleviabilitet fordi det finnes i alle metabolisk aktive celler, og konsentrasjonen av ATP vil gå ned når cellen gjennomgår prosesser som apoptose eller nekrose.

ATP bioluminescence assay er basert på lysproduksjon ved reaksjon mellom ATP og D-luciferin. Med ATP Bioluminescence assay Kit CLS II (Roche) som ble brukt i denne oppgaven kan man detektere ATP konsentrasjoner mellom 10<sup>-6</sup> og 10<sup>-11</sup> M ATP.

I assayet tilsettes enzymet luciferase, som er utvunnet fra *Photinus pyralis* (Amerikansk ildflue), til å katalysere følgende reaksjon:



D-luciferin er substratet for luciferase. I reaksjonen vil luciferase katalysere oksidasjonen av D-luciferin i nærvær av ATP og magnesium, og dette resulterer i bioluminiscens. Reaksjonen følger Michaelis likning for enzymkinetikk:

$$\text{Lysintensitet} = (V_{\max} * C_{\text{ATP}}) / K_m \quad (K_m = \text{Substrat, D-luciferin})$$

Fra likningen ser vi at lysintensitet er direkte proporsjonal med ATP konsentrasjonen ( $C_{\text{ATP}}$ ), og er avhengig av luciferase ( $V_{\max}$ ).

MA11 celler og MDA-MB-468 med 10 000 celler/brønn ble behandlet i 96 brønners brett (Costar) med ønskede konsentrasjoner av immuntoksin og/eller TPM-derivater i 24 timer. For å subtrahere bakgrunnssignal fra selve medium i prøvene, ble medium tilsatt i tomme brønner. Når ATP nedgangen skulle måles, ble brønnene først tilsatt 100 µl kokende 100 mM Tris pH 7.5 tilsatt 4 mM EDTA. Luciferase reaksjonen har sitt pH optimum ved pH rundt 7,75. Om pH verdiene fluktuerer langt fra angitte verdi, kan det påvirke lysreaksjonen. Derfor var det viktig å lage en buffer med Tris/EDTA slik at pH var mellom 7,5 og 8,0. Etter at bufferen var tilsatt, ble cellene fryst i flytende nitrogen og oppbevart ved -70 °C til luminiscens skulle måles.

Prøvene ble kokt ved 100 °C i 2 minutter og sentrifugert ved 1000 rpm i 1 minutt. 20 µl prøve ble så tilsatt i duplikat i hvit 96 brønners plate (Nunc). 50 µl Luciferase reagens ble tilsatt rett før luminiscence måling for reagenset er lyssensitiv. Det grønne lyset som detekteres, har en emisjons maksimum på 562 nm. Luminiscence ble målt ved 560 nm.

## 5.7 Proteinsyntesehemming

Alle celler trenger proteinsyntese for å overleve og dele seg. Gjennom å bruke en radiomerket aminosyre kan man måle cellens evne til å syntetisere proteiner, og om immuntoksinbehandlingen påvirker proteinsyntesen. Leucin er en aminosyre som inngår i proteinsyntesen hos alle levende celler, og radiomerket leucin har blitt benyttet i denne analysemetoden.

MA11 og MDA-MB-468 ble sådd ut med 50 000 celler/brønn i 48-brønners brett (Costar), og cellene ble behandlet med immuntoksiner og/eller TPMP. Etter 24 timers inkubasjonstid ble cellene analysert for å se hvordan proteinsyntesen hadde blitt påvirket. Cellene ble vasket to

ganger med iskald PBS. Etter vaskeprosessen ble 200 µl MEM medium (minimal essential medium, uten leucin og glutamin) med 2µl/ml <sup>3</sup>H-leucine tilsatt alle brønnene. Cellene ble så inkubert ved 37 °C i 30 minutter.

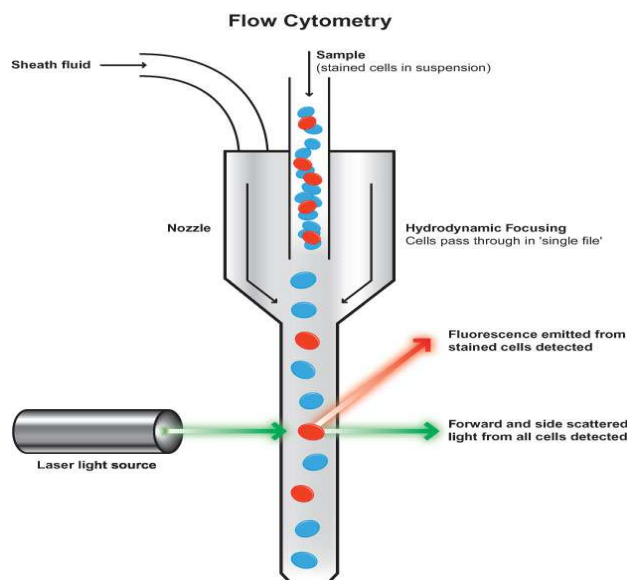
Etter inkuberingen ble cellene tilsatt 500 µl 5 % kald TCA (trichloracetic acid) for utfelling av proteiner i prøven. Det er viktig å holde TCA kald for å unngå protease aktivitet i prøven vår. Denne prosessen ble gjentatt to ganger, der cellene ble inkubert i TCA i 10 minutter ved romtemperatur. Etter at TCA ble fjernet, ble cellene tilsatt kald 500 µl 0,5 M KOH (kalium hydroksid) og inkubert i 5 minutter for at cellene skulle løsne fra brønnene. De løse cellene ble så overført til et telleglass med 2 ml Aquasafe 300+ tellervæske. Før prøvene ble analysert ble de vortexet godt.

Counts per minute (CPM) for behandlede celler ble sammenlignet med CPM for ubehandlede celler og resultatene vises som prosent leucin inkorporering. Kontrollverdien for ubehandlede celler ble satt til 100 %. Radioaktivitet ble målt i Liquid Scintillation Analyzer maskin.

## **5.8 Tunel assay**

Terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) er en teknikk for å påvise DNA fragmentering ved apoptose. I analysen vil enzymet terminal deoxynukleotidyl transferase (TdT) katalysere adderingen av deoxyuridin trifosfat (dUTP) til frie 3'-OH ender på DNA. dUTP er merket med biotin. Streptavidin binder seg til biotin med høy affinitet, og fluorescein isotiocyanat (FITC), som er fluorokromet bundet til streptavidin, fluorescerer slik at vi kan måle DNA fragmentering. Fluoroscensmerking kan også benyttes til å måle cellenes DNA ved å farge prøven med Hoechst [33258], som binder seg til A-T baseparene på DNA.

I analysen blir cellene applisert i et flowcytometer som består av lasere, speil, filtre og detektorer (Figur 5.3). Under analysen måles tre ulike parametere; forover spredning (FSC), sideveis spredning (SSC) og fluorescens. Forover spredning gir oss et grovt bilde av cellens volum, mens sideveis spredning gir informasjon om cellens kompleksitet. Hydrodynamisk fokusering i flowcellen skjer på grunn av ulik tetthet og ulik hastighet i flourvæsken og celleprøven. Dette fører til at en og en celle passerer laserlyset slik at vi kan måle flouoscens og lysspredning fra en celle av gangen.



*Figur 5.3: En lysstråle sendes gjennom hver celle. Fluorescens og lysspredning av hver celle i prøven måles [36]*

To millioner MDA-MB-468 eller MA11 celler ble sådd ut i liten 25 cm<sup>2</sup> dyrkingsflaske (nunc). Etter at cellene hadde nådd 70-90 % konfluens, ble de behandlet med immuntoksin og/eller TPMP i ulike konsentrasjoner. Etter 24 timers inkubering, ble cellene vasket i kald PBS 2X, før cellene ble tilsatt iskald metanol (-20 °C). Cellene ble så vasket i kald PBS før de ble tilsatt 35 µl nylaget TdT løsning og inkubert mørkt i 30 minutter ved 37 °C. Etter inkuberingen ble cellene vasket med kald PBS og sentrifugert i 5 minutter ved 1000 rpm. Pelletene ble resuspendert i PBS tilsatt 0,1 % Triton-X100. Triton-X100 ble brukt til permeabilisering av cellene før fargingen. Etter Triton-X100 tilsetning ble cellene tilsatt 50 µl streptavidin-FITC i PBS med 0,1 % Triton-X100 og 3 % tørrmelk og inkubert i 60 minutter ved romtemperatur. Cellene ble igjen vasket i PBS med 0,1 % Triton-X100 og sentrifugert. 400 µl nylaget Hoechst [33258] løsning ble tilsatt, og cellene ble inkubert i mørke i 30 minutter ved 4 °C. Aggregater av celler ble eliminert ved å filtrere prøvene igjennom flowrør (Falcon) med filter. Alle prøvene ble holdt på is før prøvene ble analysert i et LSR II UV laser flow cytometer.

## 5.9 Kvantitering av genuttrykk

Polymerase chain reaction (PCR) er en hyppig benyttet metode der man kan amplifisere store mengder DNA/RNA på kort tid. Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) er en type PCR der man kan måle amplifiseringen av genspesifikk cDNA mens amplifiseringen finner sted. Først isoleres RNA fra celleprøven vår. Etter at RNA er isolert, lages det komplementær DNA (cDNA), som så tilsettes ønskede genprober for å kvantitere genspesifikk cDNA.

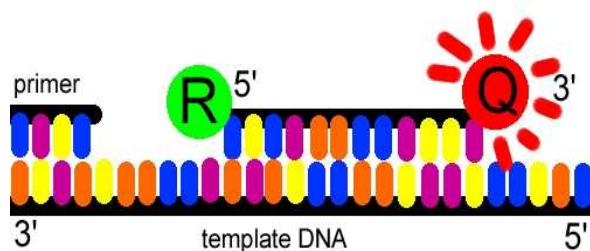
For å isolere RNA ble GeneElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) benyttet. To millioner celler ble sådd ut i liten flaske (25 cm<sup>2</sup>, nunc) og behandlet som vanlig. Når RNA skulle isoleres ble cellene først vasket 2 ganger med kald PBS, 500 µl lysisbuffer med 10 µl/ml 2-mercaptoetanol (2-ME) ble tilsatt for å lysere cellene og inaktivere RNase. De lyserte cellene ble så filtrert gjennom en filtreringskolonne (GeneElute Filtration Columns), som filtrerer prøven slik at cellerester holdes igjen i kolonnen. Filtratet ble så tilsatt 70 % etanol og filtreringsprosessen gjentatt. Etanol bidrar til at RNA binder seg til filteret (GeneElute Binding Columns), slik at andre kontaminasjoner som løsningsmiddel filtreres bort. Etter tre trinn med vaskeprosesser med to ulike vaskebuffer ble RNA eluert ved å benytte elueringsløsning som fulgte med kittet. Mengden RNA og renheten ble målt spektrofotometrisk i en Picodrop. RNA har absorpsjonsmaksimum ved 260 nm, og proteiner har absorpsjon rundt 280. En ratio av  $A_{260}/A_{280} > 1.8$  er ideell å bruke fordi det viser at RNA mengden er rent. Renheten ble også målt ved ratio  $A_{260}/A_{230}$ . Løsemidler som alkohol har absorpsjon ved 230 nm, og en ratio av  $A_{260}/A_{230} > 1.8$  ble benyttet.

Isolert RNA ble så benyttet til å lage cDNA ved å bruke High Capacity RNA to DNA Mastermix (Applied Biosystems). Løsningen inneholder blant annet enzymet revers transkriptase, RNase inhibitor protein og nukleotider. 600 ng RNA fra hver prøve ble blandet med Mastermix og cDNA syntese ble gjort i GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems) maskin.

Ved å benytte TaqMan prober ble genekspresjonen til ønskede gener analysert. En TaqMan probe består av to ulike deler, den ene er reporter delen (R-delen), og den andre er quencher delen (Q-delen) som hindrer fluoresens fra R-delen når proben er festet til templat DNA og før

polymerasen er aktiv (figur 5.4). I tillegg til TaqMan probe må det også tilsettes TaqMan Gene Expression Mastermix som blant annet inneholder nukleotider og buffere.

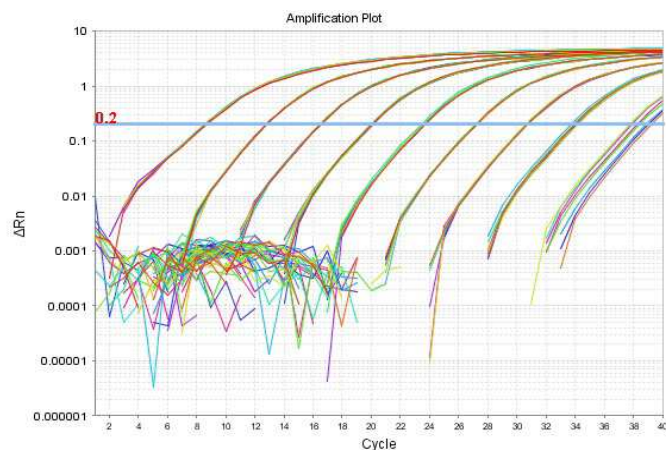
Etter at DNA har denaturert og vi har fått enkeltråd, vil TaqMan proben binde seg til sin komplementære DNA tråden, og *Taq* polymerasen vil addere nukleotider til DNA tråden. *Taq* polymerasen vil også kløyve proben ved 5' enden slik at R-delen separeres fra Q-delen under forlengelsen av DNA tråden. Dette fører til at R-delen kan frigi energi i form av fluorescens. Reporter molekylet kløyves fra proben ved hver syklus, slik at økning i fluorescens er proporsjonal med amplifiseringen.



Figur 5.4: TaqMan probe. Består av en reporter (R-del), en quencher (Q-delen).

For å måle endring i genuttrykk ved behandling brukes likningen  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , hvor  $\Delta\Delta C_t = (C_{TM\text{ålg}} - C_{TGAPDH})_{\text{Behandlet prøve}} - (C_{TM\text{ålg}} - C_{TGAPDH})_{\text{ubehandlet prøve}}$ . Threshold cycle ( $C_T$ ) verdi er syklusen der en statistisk signifikant økning i  $\Delta R_n$  (endring i fluorescens) blir detektert første gangen.  $C_T$  verdiene av behandlet og ubehandlet må normaliseres med et housekeeping gen for å kontrollere at alle prøvene har lik mengde cDNA slik at prøvene standardiseres. I oppgaven har Glyceraldehyd 3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) blitt benyttet som housekeeping gen. Genet ble valgt basert på tidligere data fra gruppen der GAPDH genekspressjon har vist seg å være uforandret når cellene behandles med immuntoksin/TPM-derivat.





*Figur 5.5: RT-qPCR amplifiseringsgraf.*

## 5.10 In vitro klonal vekst assay

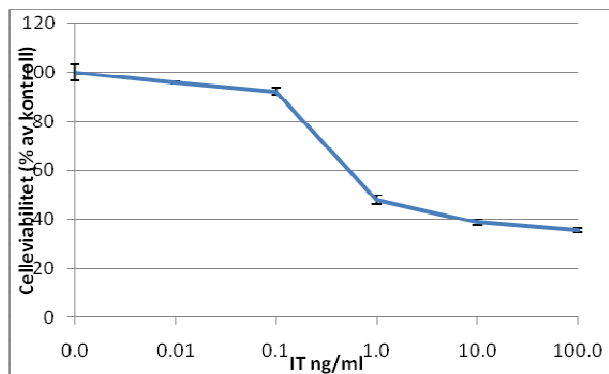
Ved klonal vekst ser man på enkeltcellens evne til å proliferere og gi opphav til en hel klon, som er en ansamling av celler med opphav fra én enkel celle [37].

150 celler ble sådd ut i 6 brønners brett (Costar) og inkubert i 3 uker. Etter inkuberingen ble medium sugd av og iskald metanol med tilsatt. Etter ett minutt inkubering ble metanol pipetert av. Krystallfiolett fortynnet i vann (sluttkonsentrasjon 0.05 %) ble brukt til å farge koloniene. Etter at overskudd med fargeløsning ble pipetert bort, ble koloniene telt på en Gerber-teller, som er trykksensitiv med en teller, slik at ved å markere hver koloni med markeringspenn, registreres antall kolonier.

## 6. Resultater

### 6.1 Behandling med immuntoksin gir nedgang i celleviabilitet og celleproliferasjon

Det har tidligere blitt vist at immuntoksin forårsaker en nedgang i celleviabilitet i kreftceller in vitro [27, 38, 39]. For å analysere om immuntoksinet MOC31PE gir en nedgang i celleviabilitet, ble MDA-MB-468 og MA11 celler behandlet med immuntoksin og MTS-analyse ble utført.

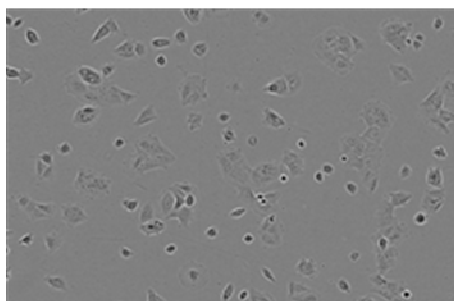


*Figur 6.1: MTS-assay etter behandling med immuntoksin (IT). MA11 celler (7500/brønn) ble sådd ut i 96 brønners brett. Etter 24 timer ble de behandlet med ulike konsentrasjoner med MOC31PE (her forkortet med IT) og inkubert i 24 timer. Konsentrasjonene av immuntoksin er valgt med bakgrunn fra tidligere data. MTS-analyse ble så utført for å bestemme mengden av viable celler. Celleviabilitetsverdiene for behandlede celler ble sammenlignet med verdiene for ubehandlede celler (100 %). (n=3)*

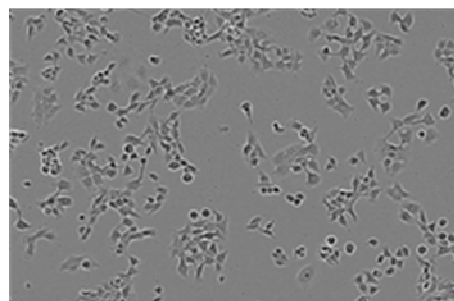
Celleviabilitetsanalysen viste en konsentrasjonsavhengig reduksjon i celleviabilitet med MOC31PE i MA11 celler (Figur 6.1). Ut fra grafen kan vi se at ved behandling med MOC31PE 10 ng/ml hadde vi nesten 60 % nedgang i celleviabilitet og med 1 ng/ml hadde vi omtrent 55 % nedgang. Antall levende celler ble bemerkelsesverdig redusert med økt MOC31PE konsentrasjon.

For å studere hvordan celled morfologien endrer seg med immuntoksinbehandling, ble det utført en proliferasjonsanalyse ved å benytte IncuCyte maskin. Maskinen inneholder en inkubator og et mikroskop med kamera som tar bilder av celler ved faste tidsintervaller. Metoden gir oss mulighet til å se hvordan antall kreftceller endrer seg over tid mens cellene får lov til å vokse ved

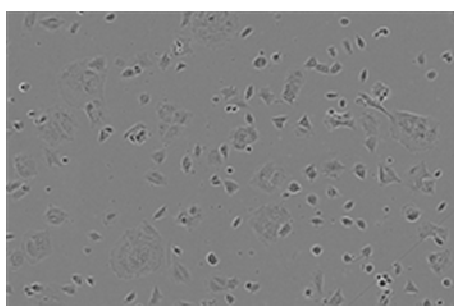
optimale dyrkingsbetingelser. Metoden gir også mulighet til å bestemme eventuell årsak til nedsatt proliferasjon, enten om det er på grunn av redusert celledeling eller om de dør som følge av behandling.



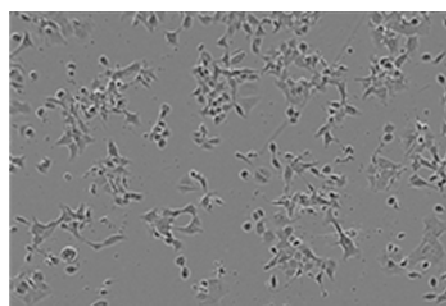
Kontroll 0t



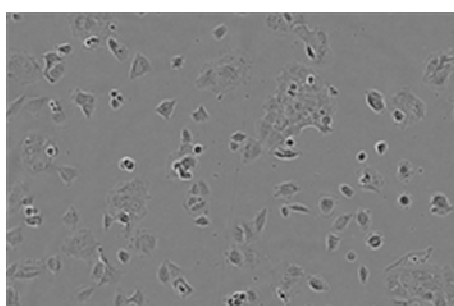
Kontroll 24t



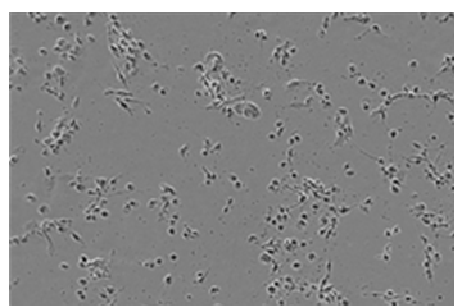
IT 0.1ng/ml 0t



IT 0.1ng/ml 24t



IT 10ng/ml 0t

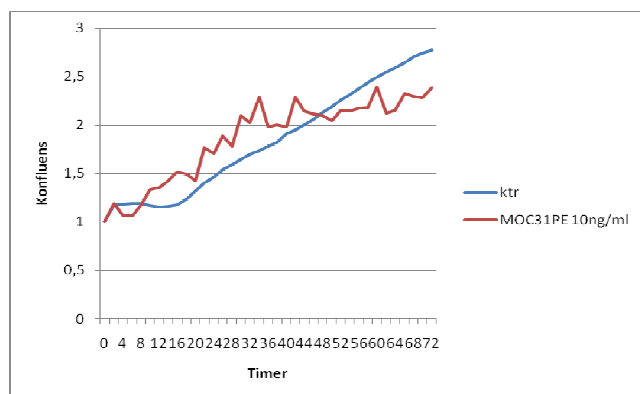


IT 10ng/ml 24t

*Figur 6.2: ``Live imaging`` bilder fra IncuCyte-maskin. MA11 celler ble sådd ut i 96 brønners brett med 10 000 celler/brønn. Etter 24 timer ble cellene tilsatt MOC31PE i ulike konsentrasjoner. Cellene ble så inkubert i CO<sub>2</sub> inkubator i 72 timer (bilde fra 24 timers behandling) med et kamera som tok bilder ved bestemte tidspunkter. (n=2)*

Behandling med MOC31PE 0,1 ng/ml gir lite cytotoksisk effekt etter 24 timers behandling, mens behandling med MOC31PE 10 ng/ml gir nesten ingen celleoverlevelse (Figur 6.2). Det er også lettere å se hvordan cellemorfologien endrer seg ved behandling med MOC31PE 10 ng/ml. Det er kjent at en av de morfologiske endringene ved apoptose er celleskrumpning, og vi kan se slike morfologiske endringer ved 24 timers behandling med MOC31PE 10 ng/ml. Bildet kan også tyde på at vi har dannelse av ``apoptotic bodies`` som er små vesikler med DNA/RNA og ulike intracellulære proteiner [40], og som også er et kjennetegn ved apoptotisk celledød.

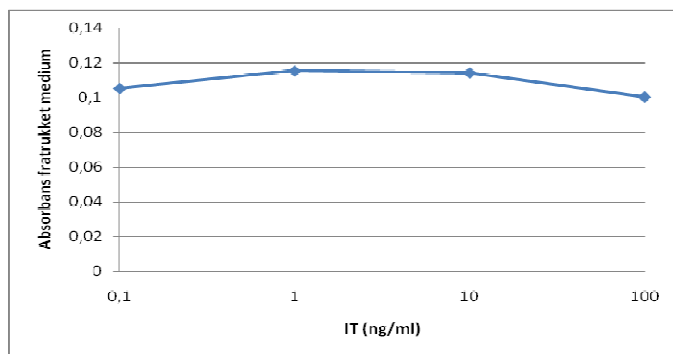
For å kvantitere effekten av immuntoksin, ble cellekonfluensen i kontrollbrønner og i immuntoksin behandlede brønner målt (Figur 6.3).



*Figur 6.3: Proliferasjonsgraf fra proliferasjonsanalyse. MA11 celler behandlet med IT 10ng/ml i 72 timer. Immuntoksin ble tilsatt 24 timer etter at cellene ble sådd ut.*

*Konfluensen er et mål på hvor tette cellene vokste i brønn, og det ble plottet mot antall timer med behandling. Resultatene er presentert som grafer der vi har konfluens på y-aksen og antall timer inkubert på x-aksen. For å få lik utgangspunkt i alle prøvene, normaliseres konfluensen ved hvert målepunkt med konfluensen for start. Dette var nødvendig på grunn av ulik konfluens i brønnene. (n=2)*

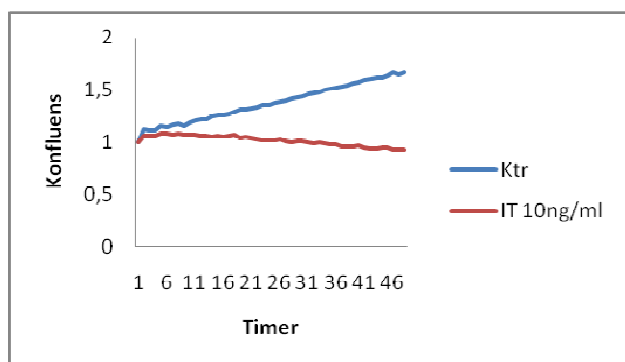
Grafen for celler behandlet med MOC31PE viser et ``taggete`` utseende som tyder på at døde celler forstyrrer målingene av celletetthet. Grafen viser at immuntoksin påvirker veksten allerede noen timer etter at immuntoksinet er tilsatt. Vi ser også at grafen for behandlede celler stiger over grafen for ubehandlet omtrent etter 12 timer, og dermed flater kurven ut under grafen for ubehandlet etter omtrent 40 timer.



*Figur 6.4: MTS-assay etter behandling med immuntoksin (IT). MDA-MB-468 celler ble sådd ut i 96 brønners brett med 7500 celler/brønn. Etter 24 timer ble de behandlet med ulike konsentrasjoner med MOC31PE (IT). Etter 24 timers inkubering med immuntoksin, ble prøvene tilsatt MTS-reagens for å måle absorbansen. (n=3)*

Immuntoksin-behandlede MDA-MB-468 celler viste ingen hemming i celleviabilitet ved MTS-tilsetning til celleprøvene (Figur 6.4). Det ble ikke observert noen fargeendring visuelt, og det ble heller ikke målt noe høyere absorbans i kontrollen med ubehandlede celler enn i kontrollbrønner med bare medium.

For å finne ut om MDA-MB-468 responderer på immuntoksinbehandling, ble det utført en celleproliferasjonsanalyse ved hjelp av en IncuCyte-maskin (Figur 6.5).

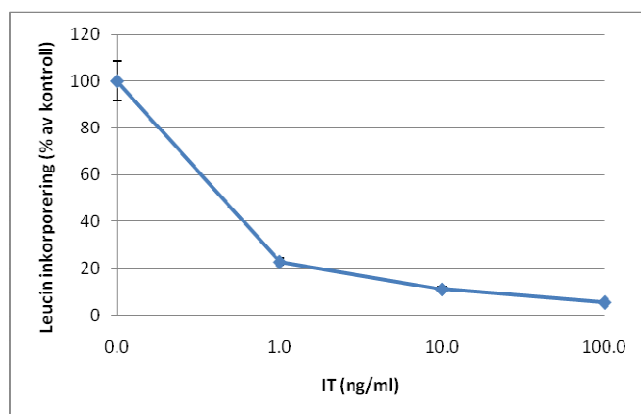


*Figur 6.5: Proliferasjonsgraf etter behandling med immuntoksin (IT). MDA-MB-468 celler ble sådd ut i 96 brønners brett med 10 000 celler/brønn og etter 24 timer ble de behandlet med MOC31PE 10 ng/ml i 48 timer. For å få likt utgangspunkt i alle prøvene normaliseres konfluensen ved hvert målepunkt med konfluensen for start. (n=2)*

Ved behandling med MOC31PE 10 ng/ml ser vi klart en nedgang i konfluensen. Immuntoksin gir en rask hemming av celleveksten sammenlignet med kontrollen (Figur 6.5). I motsetning til MA11 (Figur 6.3) ser vi ingen økning i celleproliferasjon i begynnelsen av immuntoksinbehandling. Nedgangen gikk jevnt nedover, noe som indikerer at effekten av immuntoksin øker med tiden.

## 6.2 Immuntoksin hemmer proteinsyntesen

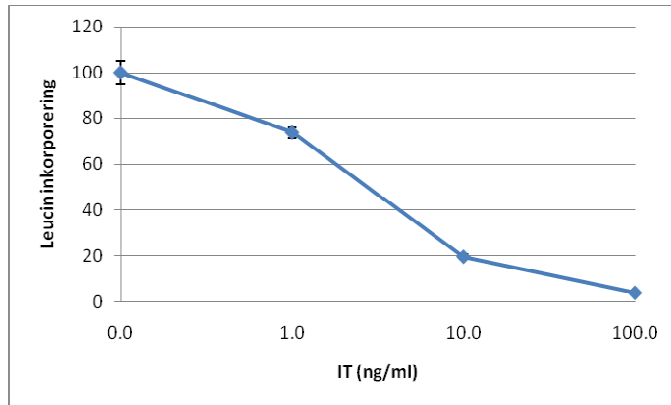
Vi kan ikke konkludere fra celleviabilitetsanalysen og celleproliferasjonsanalysen grunnen til nedgangen i celleviabilitet. For å studere om MOC31PE inhiberer proteinsyntesen, ble det utført proteinsynteseanalyser hvor evnen til å ta opp radiomerket leucin i behandlede celler ble sammenlignet med evnen til å ta opp radiomerket leucin i ubehandlede celler. Konsentrasjonene til immuntoksin ble valgt basert på tidligere data. Resultatene er presentert som grafer der verdiene av ubehandlede celler er satt til 100 % inkorporert radiomerket leucin.



*Figur 6.6: Proteinsyntesehemming etter behandling med immuntoksin (IT). MA11 celler ble sådd ut i 48 brønners brett med med 50 000 celler/brønn. Cellene ble behandlet med ulike konsentrasjoner av MOC31PE (IT) etter 24 timers inkuberingstid ble cellenes proteinsyntese målt ved hjelp av  $^3\text{[H]}$ -leucin inkorporering. Resultatene er presentert i prosent  $^3\text{[H]}$ -leucin inkorporering der verdiene for ubehandlede celler er satt til 100 %. ( $n=3$ )*

MOC31PE (IT) hemmer proteinsyntesen i MA11 celler (Figur 6.6). Økt hemming ble observert med økt mengde immuntoksin tilsvarende dose-respons kurven observert i celleviabilitets

analysen (Figur 6.1), og behandling med MOC31PE 10 ng/ml gir nesten 90 % nedgang i proteinsyntesen. MOC31PE 0,1 ng/ml er ikke inkludert i analysen, men resultatene fra MTS viste minimal nedgang (8 %) i celleviabilitet (Figur 6.1).



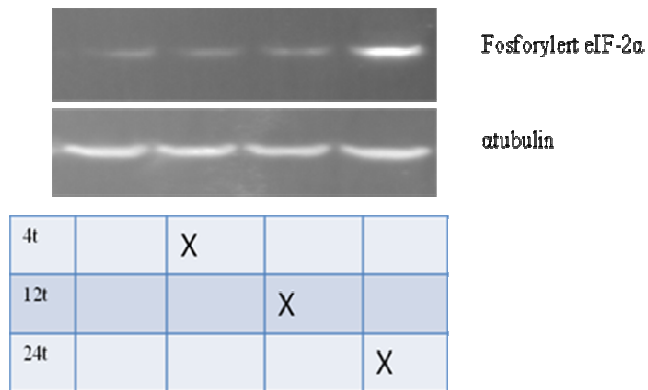
*Figur 6.7: Proteinsyntesehemming etter behandling med immuntoksin (IT). MDA-MB-468 ble sådd ut i 46 brønners brett med 50 000 celler/brønn. Etter 24 timer ble de behandlet med ulike konsentrasjoner av MOC31PE (IT). Etter 24 timers behandlingstid ble det målt leucin inkorporering. Resultatene er presentert som prosent leucin inkorporering der verdiene for ubehandlede celler er satt til 100 %. (n=3)*

MOC31PE har også en konsentrasjonsavhengig effekt på proteinsyntesen i MDA-MB-468 celler (Figur 6.7). MOC31PE 10 ng/ml gir omtrent 80 % hemming i leucin inkorporering, mens MOC31PE 1 ng/ml gir omtrent 25 % hemming i leucininkorporering. Målet med dette forsøket var å evaluere hvilken immuntoksinkonsentrasjon som skulle benyttes for å analysere synergistisk cytotoxisk effekt mellom immuntoksin og TPM-derivater. Ut fra disse resultatene ble det valgt å fortsette med MOC31PE 10 ng/ml siden konsentrasjonen ikke gir fullstendig hemming men likevel gir en bemerkelsesverdig nedgang i proteinsyntesen. Av erfaring vet vi at effekten av immuntoksin på proteinsyntesen er større enn effekten på celleviabilitet.

### **6.3 Immuntoksin har effekt på eukaryotisk initieringsfaktor (eIF-2 $\alpha$ )**

Immunblott analyse ble benyttet for å evaluere effekten av MOC31PE på proteinekspresjonen og modifiseringer av eukaryotisk initieringsfaktor 2 $\alpha$  (eIF-2 $\alpha$ ). I denne analysen ville vi også se om effekten av MOC31PE var tidsavhengig. Konsentrasjonene av MOC31PE er valgt ut fra

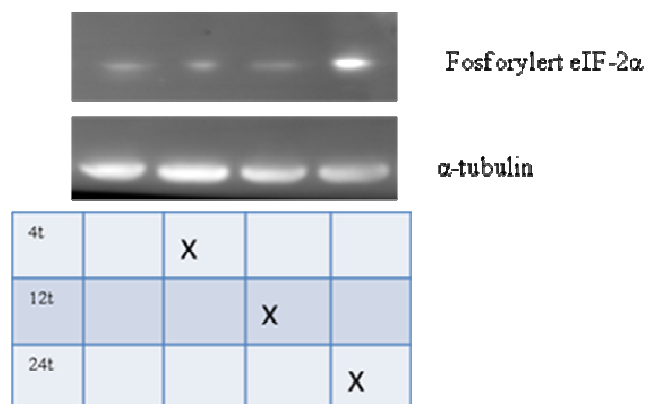
proteinsynteseanalysen. Eukaryotisk initieringsfaktor 2 $\alpha$  (eIF-2 $\alpha$ ) er essensiell i proteinsyntesen, cellevekst og celleproliferasjon [41]. Når celler utsettes for ulike stressfaktorer fås en fosforylering av  $\alpha$ -subenheten, som fører til nedregulering av proteinsyntesen [42].



*Figur 6.8: Fosforyleringen av  $\alpha$ 2-subenheten av eIF etter behandling med immuntoksin ved ulike tidsintervaller. På første rad fra venstre vises ubehandlet kontroll. MA11 celler ble sådd ut i liten flaske og etter 24 timer ble cellene behandlet med MOC31PE 10 ng/ml i 4, 12 og 24 timer. Proteiner i prøven ble separert ved hjelp av gelelektroforese og ble så overført til PVDF-membran. For å detektere spesifikke proteiner, benyttet vi antistoffer. Som loadingkontroll brukte vi  $\alpha$ -tubulin. Bildet ble fremkalt etter to minutters fremkalling med frekallingssubstrat. (n=3)*

MA11 celler ble behandlet med MOC31PE 10 ng/ml i 4, 12 og 24 timer (Figur 6.8). Etter behandlingen så vi en økt fosforylering av  $\alpha$ -subenheten etter 24 timers behandling. Vi ser imidlertid ikke den samme effekten etter 4 og 12 timers behandling med immuntoksin.



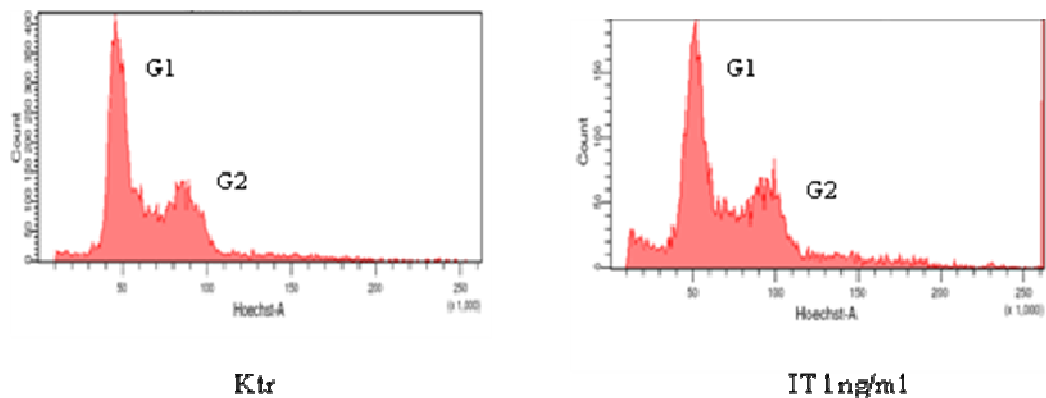


*Figur 6.9: Fosforyleringen av  $\alpha$ 2-subenheten av eIF etter behandling med immuntoksin ved ulike tidsintervaller. På første rad til venstre vises ubehandlet kontroll. MDA-MB-468 ble på samme måte som MA11 behandlet med MOC31PE 10 ng/ml i 4, 12 og 24 timer. Bildet viser hvordan fosforyleringen av  $\alpha$ -subenheten av eIF påvirkes ved behandling med immuntoksin ved ulike tidsintervaller. (n=3)*

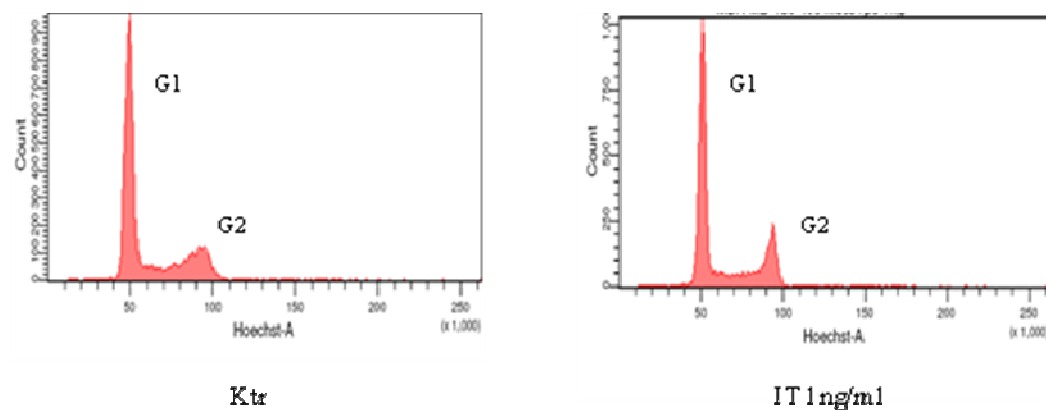
Behandling av MDA-MB-468 med MOC31PE 10 ng/ml i ulike tidsintervaller viste økt fosforylering av  $\alpha$ -subenheten etter 24 timer (Figur 6.9). Disse resultatene er i tråd med proteinsyntese analysene som også viser nedgang i proteinsyntesen etter behandling med MOC31PE 10 ng/ml etter 24 timer (Figur 6.7). Resultatene viser at fosforyleringen av  $\alpha$ -subenheten er tidsavhengig. Vi ser ikke økt fosforylering etter 4 og 12 timer sammenlignet med kontroll.

## 6.4 Behandling med MOC31PE påvirker ikke cellesyklusen

For å analysere om redusert celleviabilitet etter immuntoksinbehandling kan være forårsaket av cellesyklusarrest, ble det utført flowcytometri.



Figur 6.10: Flowcytometri der ulike faser i cellesyklusen vises etter behandling med immuntoksin (IT). To millioner MA11 celler ble sådd ut i 25cm<sup>2</sup> flasker og etter 24 timer ble de behandlet med MOC31PE 1 ng/ml. Cellene ble merket med fluorokrom og benyttet i flowcytometri. (n=2)

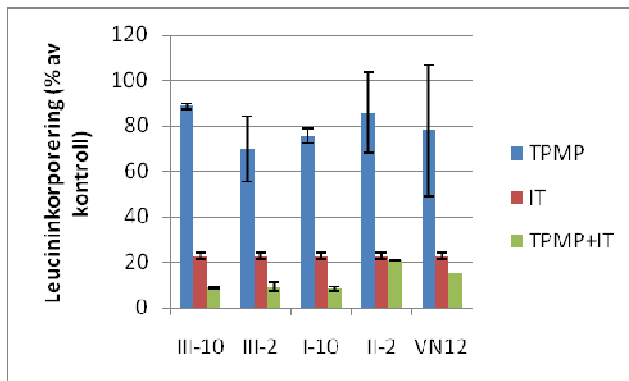


Figur 6.11: Flowcytometri der ulike faser i cellesyklusen vises etter behandling med immuntoksin (IT). To millioner MDA-MB-468 celler ble sådd ut i 25cm<sup>2</sup> flasker og etter 24 timer ble de behandlet med MOC31PE 1 ng/ml. Cellene ble merket med fluorokrom og benyttet i flowcytometri. (n=2)

Cellesyklusen var upåvirket av MOC31PE behandling i MA11 og MDA-MB-468 celler. Det var ingen forskjell på G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub> toppene for kontroll med ubehandlede celler og for immuntoksin behandlede prøvene.

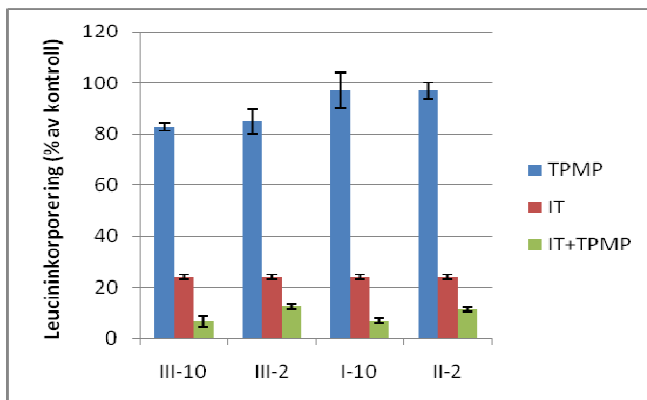
## 6.5 Behandling med immuntoksin og ulike TPM-derivater viser synergisk cytotoksitet

Det har tidligere blitt vist at ulike TPM-derivater kan indusere cellesyklusarrest [31], og at immuntoksin kan indusere proteinsyntesehemming i ulike kreftcellelinjer. Det er fortsatt uklarerheter rundt den eksakte anticancer mekanismen til TPM-derivatene, men det er foreslått at de påvirker de ulike fasene i cellesyklusen, avhengig av deres sidekjede [31]. Det er av interesse å behandle kreft med flere legemidler samtidig, da ulike typer legemidler kan angripe forskjellige cellulære mekanismer. For å se om immuntoksin med sin proteinsyntese hemmende effekt virker bedre med TPM-derivater, ble det utført ulike analyser for å evaluere den synergistiske celledøds effekten.



*Figur 6.12: Proteinsyntesehemming etter behandling med MOC31PE (IT) og/eller TPMP. MA11 celler ble sådd ut og behandlet med immuntoksin og/eller TPM-derivater som tidligere nevnt for proteinsyntesehemmings analyse. (n=3)*

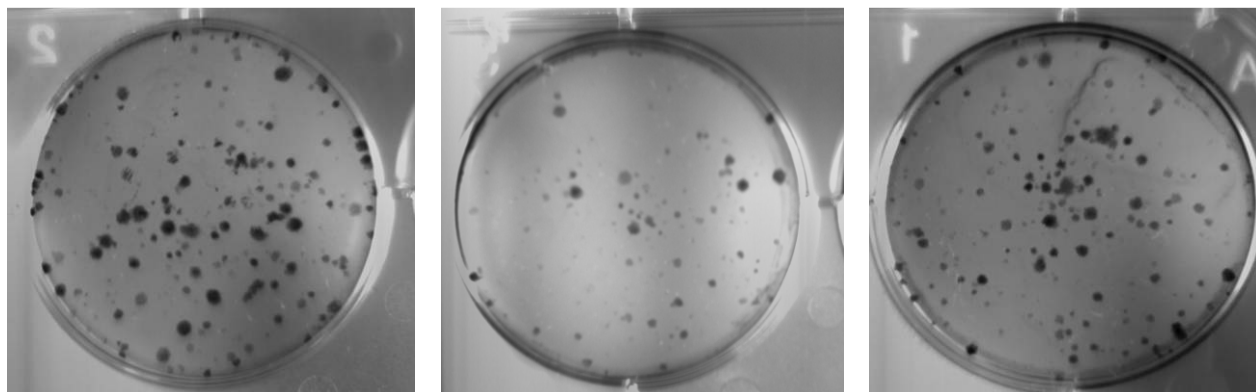
Grafen viser at behandling med 1ng/ml MOC31PE gir nesten 80 % nedgang i [ $^3\text{H}$ ]-leucin inkorporering (Figur 6.12). Konsentrasjonene av TPM-derivatene på 10 $\mu\text{M}$  er valgt basert på tidligere data der det har blitt vist at  $\text{IC}_{50} < 100\mu\text{M}$  [31], samt titreringsforsøk utført i forbindelse med denne oppgaven. De ulike TPM-derivatene viser ikke store forskjeller i forhold til hverandre og kontroll (100 %) når de tilsettes alene, men ved samtidig behandling med MOC31PE reduseres [ $^3\text{H}$ ]-leucin inkorporeringen ytterligere. VN12 er et TPM-derivat som gir økt proteinsyntesehemming i kombinasjon med immuntoksin i MA11 celler (Risberg et al, 2011 Journal of Immunotherapy (in press)) og brukes her som positiv kontroll.



*Figur 6.13: Proteinsyntesehemming ble studert ved å kombinere MOC31PE 10ng/ml med ulike TPM-derivater i MDA-MB-468 celler. Cellene ble sådd og ut og behandlet på samme måte som beskrevet tidligere. Leucin inkorporering ble målt etter 24 timers behandling med immuntoksin og TPM-derivater. (n=3)*

Proteinsyntesen påvirkes i liten grad etter behandling med TPM-derivater alene. Som vi har observert tidligere, ser vi også her en omtrent 80 % nedgang i leucininkorporering ved behandling med MOC31PE 10 ng/ml (Figur 6.7). En kombinasjon med MOC31PE og de ulike TPM-derivatene viser 85-90 % reduksjon i leucininkorporering.

Klonal vekst metoden gir muligheten til å studere kreftcellenes evne til å danne kloner ved behandling med antikreftagenser. Denne metoden ble brukt på MDA-MB-468 celler for å studere effekten av immuntoksin og TPMP I-10 behandling.



*Kontroll 3 uker*

*IT 0,1 ng/ml 3 uker*

*TPMP I-10 0,1 µM 3 uker*

*Figur 6.14: Klonal vekst bilder etter behandling med immuntoksin (IT) og TPMP I-10. MDA-MB-468 ble sådd ut i 6-brønners brett med 150 celler/brønn og behandlet med MOC31PE (IT) 0,1 ng/ml eller TPMP I-10 0,1 µM i 3 uker. Tilsetning av immuntoksin og TPMP I-10 ble gjort samtidig som cellene ble sådd ut. Etter avsluttet behandling ble koloniene farget med krystallfiolett for å lett kunne telle antall kolonier. (n=2)*

Tabell I: Gjennomsnittet av antall kolonier telt etter farging med krystallfiolett:

	Antall kolonier (gjennomsnitt av 3 brønner)
Kontroll	71
MOC31PE 0,1 ng/ml	29
TPMP I-10 0,1 µM	62

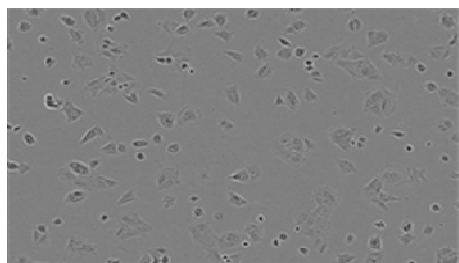
MDA-MB-468 celler ble behandlet med MOC31PE eller TPMP I-10 i 3 uker (Figur 6.14). For å finne optimal inkuberingstid og rett antall celler/brønn, ble det først utført et tidligere forsøk med samme antall celler/brønn for å finne når koloniene fikk en passe størrelse.

Tabell 1 viser gjennomsnittet av antall kolonier i 3 brønner. Vi ser fra bildene at det er færre kolonier i immuntoksinbehandlet brønn. Det var ikke stor nedgang i antall kolonier etter

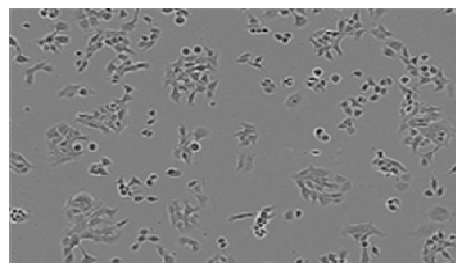
behandling med 0,1  $\mu$ M TPMP I-10. Den lave konsentrasjonen av MOC31PE og TPMP I-10 er valgt i dette forsøket basert på et forsøk som ble gjort tidligere med høyere konsentrasjoner henholdsvis 10 ng/ml og 10  $\mu$ M. I det forsøket var det få kolonier igjen etter 3 uker behandling (ikke vist). Dermed ble det vanskelig å undersøke om en kombinasjon av immuntoksin og TPMP var mer effektiv enn hver behandling alene.

MA11 celler ble også sådd ut på samme måte som MDA-MB-468 celler. Det var tilnærmet ingen kolonier etter 3 ukers inkubering, noe som indikerer at MA11 celler ikke klarer å vokse når få celler blir utsådd (ikke vist).

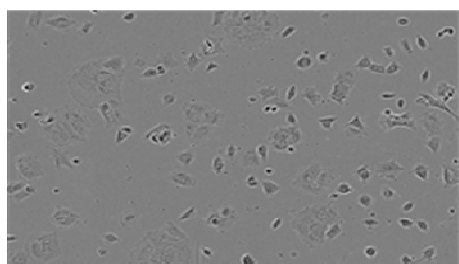
For å studere hvordan celleproliferasjonen påvirkes av immuntoksinbehandling og/eller TPMP i MA11 celler, ble det utført en proliferasjons analyse i IncuCyte maskin.



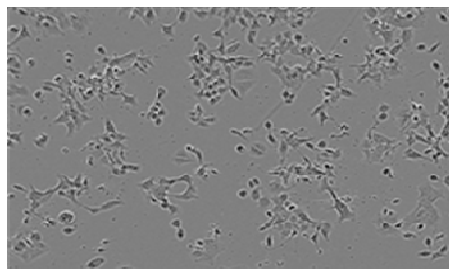
**Ktr0t**



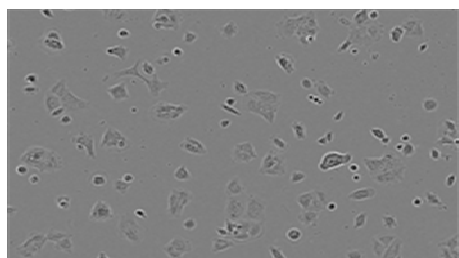
**Ktr24t**



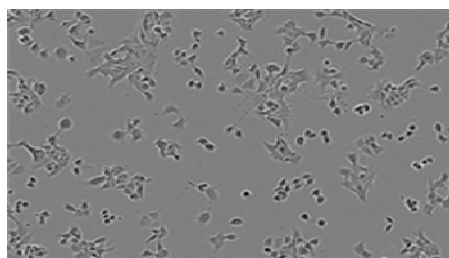
**IT0.1ng/ml0t**



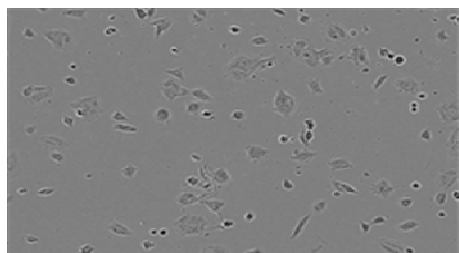
**IT0.1ng/ml124t**



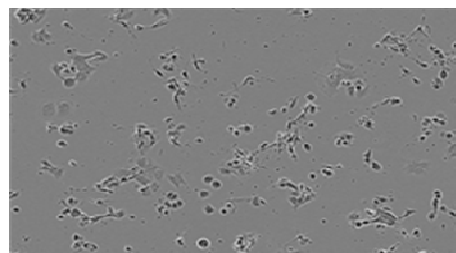
**TPMP I-10 0t**



**TPMP I-10 24t**

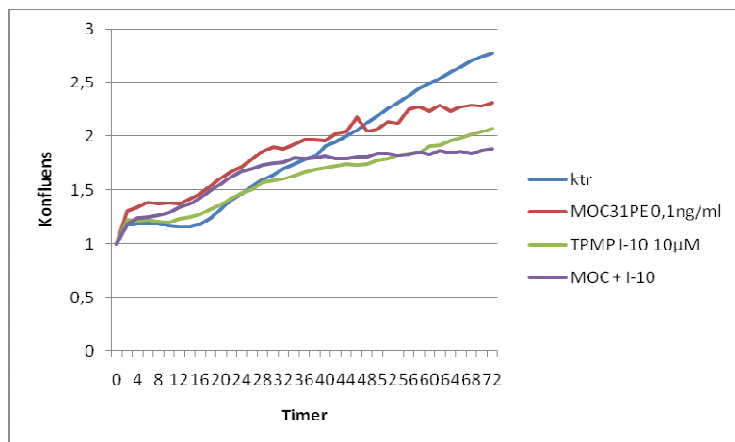


**IT + TPMP 0t**



**IT + TPMP 24t**

*Figur 6.15: ``Live imaging`` bilder av MA11 celler etter behandling med immuntoksin og/eller TPMP I-10. (n=2)*



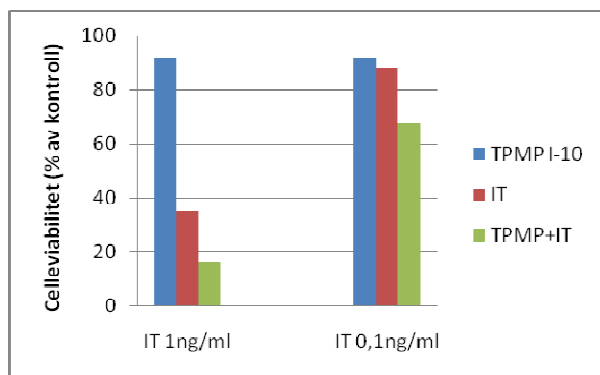
*Figur 6.16: Proliferasjonsgraf etter behandling med immuntoksin og/eller TPMP I-10.*

*MA11 celler ble sådd ut 96 brønners brett med 10 000 celler/brønn og etter 24 timer ble de behandlet med MOC31PE 0,1 ng/ml og TPMP I-10 10 µM i 72 timer. (n=2)*

Behandling med MOC31PE 0,1 ng/ml viste redusert proliferasjon sammenlignet med ubehandlet kontroll (Figur 6.16). Etter behandling med MOC31PE ser vi først en økning i cellevekst, og så en nedgang etter omtrent 40 timer. Behandling med TPMP I-10 og MOC31PE 0,1 ng/ml viser mest nedgang i cellevekst, og indikerer igjen at vi har synergistisk cytotoxiskitet, selv med den lave immuntoksin konsentrasjonen. Det kan verifiseres ut fra bildene der morfologiske endringene tyder på celledød (Figur 6.15). Behandling med den lave konsentrasjonen med immuntoksin alene viste ikke veldig stor effekt, men vi ser likevel en tendens til redusert proliferasjon.

Siden et klonal-assay ikke lot seg gjennomføre med MA11 celler, ble det i tillegg til celleproliferasjonsanalysen i IncuCyte utført en celleviabilitetsassay for å studere den kombinerte effekten av MOC31PE og TPMP I-10.





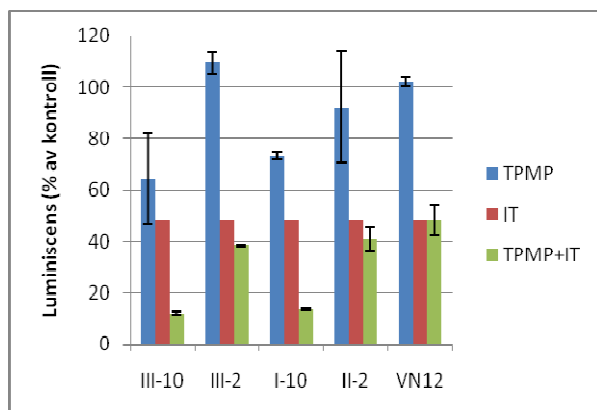
*Figur 6.17: MTS-assay etter behandling med immuntoksin (IT) og/eller TPMP I-10.*

*MA11 celler ble behandlet i 96 brønners brett med MOC31PE 1 ng/ml og/eller 0,1 ng/ml og TPMP I-10 10 µM i 24 timer. Etter endt behandling ble MTS reagens tilsatt og inkubert i 1-3 timer. Deretter ble absorbansen målt. (n=2)*

Behandling med MOC31PE 1 ng/ml gir omtrent 65 % nedgang i celleviabilitet, og behandling med MOC31PE 0,1 ng/ml gir omtrent 10 % nedgang i celleviabilitet (Figur 6.17). Alene gir TPMP I-10 10 µM minimal effekt på celleviabilitet, men sammen med MOC31PE ser vi en synergistisk nedgang i celleviabilitet. Det er en nesten 90 % nedgang i celleviabilitet ved behandling med TPMP sammen med MOC31PE 1 ng/ml sammenlignet med omtrent 30 % nedgang ved behandling med TPMP sammen med MOC31PE 0,1 ng/ml.

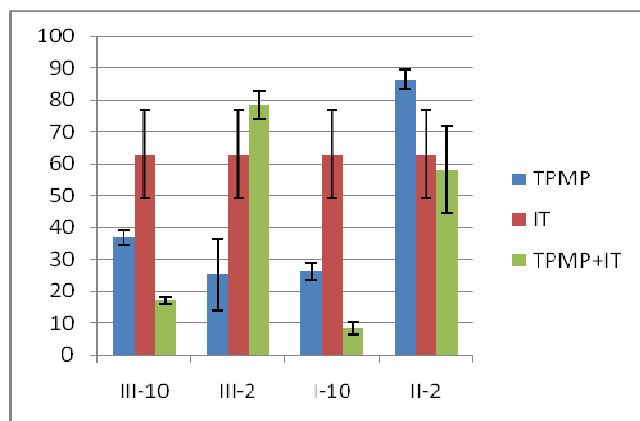
## **6.6 Kombinasjonsbehandlingen immuntoksiner og TPM-derivater forandrer ATP-nivået i celler**

Det er kjent at prolifererende celler trenger ATP som energikilde, og at næringsopptaket blant annet er påvirket av ATP tilgjengelighet [43]. Med bakgrunn i dette ble ATP-analyse utført i MA11 celler og MDA-MB-468 celler.



*Figur 6.18: ATP-assay etter behandling med immuntoksin og/eller TPMP. MA11 celler ble sådd ut i 96 brønners brett med 10 000 celler/brønn og behandlet med MOC31PE 1 ng/ml og/eller TPM-derivater 10  $\mu$ M i 24 timer. Etter behandling ble det tilsatt luciferase reagens som mål på ATP-nivå og absorbansen ble målt. Ubehandlede kontrollceller er satt til 100 %. ( $n>3$ )*

ATP-assay viste tilsvarende synergisk effekt som i proteinsynteseanalyse (Figur 6.12) – og celleviabilitetsanalyse (Figur 6.17). Behandling med kun TPM-derivater synes å påvirke ATP-nivået. TPMP III-10 og TPMP I-10 alene gir omtrent 30 % nedgang i ATP nivå. Resultatene kan tyde på at kombinasjon med MOC31PE og TPMP I-10/TPMP III-10 gir mest nedgang i ATP-nivået.



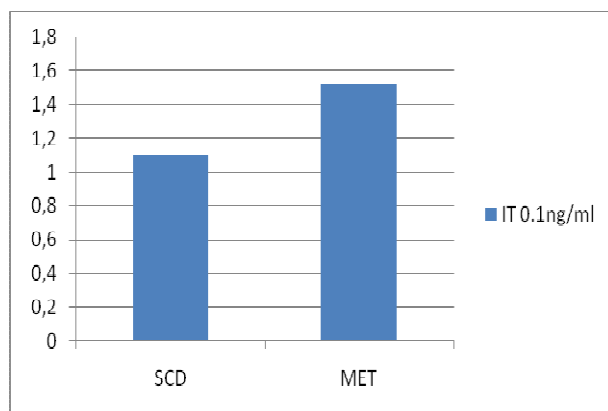
*Figur 6.19: ATP-assay etter behandling med immuntoksin og/eller TPMP. MDA-MB-468 ble sådd ut i 96 brønners brett med 10 000 celler/brønn og behandlet med MOC31PE 10*

*ng/ml og ulike TPM-derivater 10  $\mu$ M i 24 timer. Etter endt behandling ble luminiscens målt ved 560 nm. Verdien i ubehandlede celler er satt til 100 %. (n>3)*

ATP-nivået viste seg å være mer sensitiv for de ulike TPM-derivatene i MDA-MB-468 (Figur 6.19) i forhold til i MA11 celler (Figur 6.18). Det var kun TPMP II-2 som viste mindre effekt i forhold til de andre TPM-derivatene. Mest synergistisk effekt målt som lavest ATP-nivå i cellene var med MOC31PE og TPMP I-10/TPMP III-10, med omtrent 90 % nedgang i ATP-nivå. MOC31PE alene gav omtrent 40 % nedgang i ATP-nivå. (n=3)

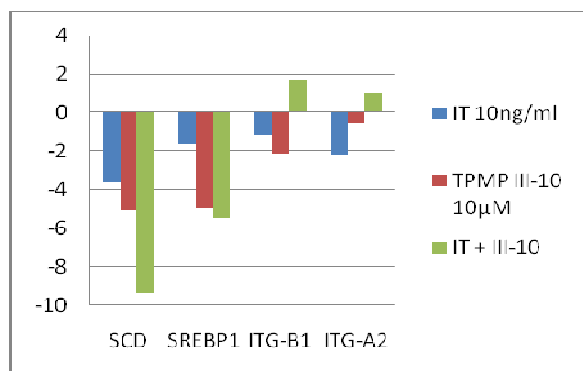
## **6.7 Behandling med immuntoksin påvirker stearoyl-Coenzym A desaturase 1 genuttrykket i MDA-MB-468**

Etter behandling med immuntoksin og TPM-derivater har det tidligere blitt rapportert en nedgang i stearoyl-Coenzym A desaturase 1 (SCD) genekspressjonen (Risberg et al, 2011 Journal of Immunotherapy (in press)). Basert på disse dataene var vi interessert i å finne ut om MOC31PE har en liknende effekt i MA11 og MDA-MB-468 celler.



*Figur 6.20: Genekspressjonen til SCD og MET etter behandling med immuntoksin (IT). To millioner MA11 celler ble sådd i 25 cm<sup>2</sup> flasker og etter 70-80 % konfluens, ble cellene behandlet med MOC31PE 0,1 ng/ml i 24 timer. Etter endt behandling ble RNA isolert og RT-PCR utført for SCD og MET. (n=2)*

Genekspressjonen til SCD enzymet var ikke påvirket etter behandling med MOC31PE 0,1 ng/ml (Figur 6.20). Parallelt ble ekspressjonen til MET målt, siden ekspressjonen av dette genet var viste oppregulering ved et annet forsøk utført av et gruppemedlem (Merete Thune Wiiger).

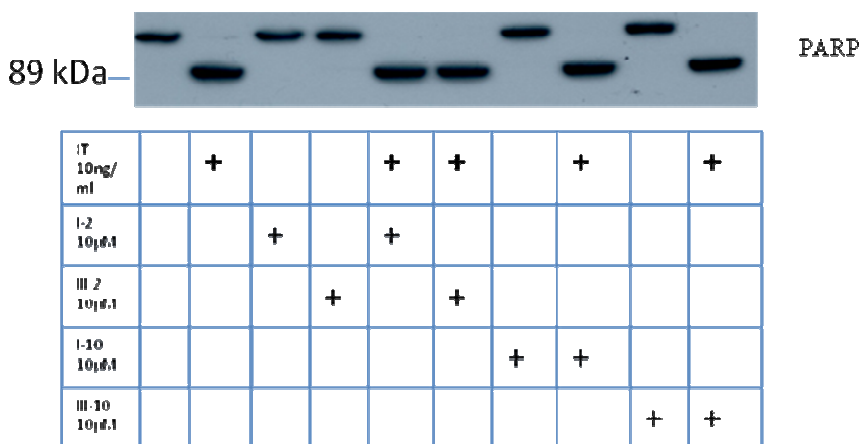


*Figur 6.21: Genekspresjonen til SCD og MET etter behandling med immuntoksin (IT). MDA-MB-468 celler ble sådd ut på samme måte som MA11 og behandlet med 10 ng/ml MOC31PE og TPMP I-10 10 µM i 24 timer. Etter behandlingen ble RNA isolert og cDNA ble syntetisert. Genekspresjonen til SCD enzymet og transkripsjonsfaktoren SREBP1 ble studert, samt de ulike integrinene, ITG-β1 og ITG-α2. (n=2)*

Behandling med MOC31PE og TPMP I-10 viste en synergistisk nedgang i genuttrykket til SCD og SREBP1, mens genekspresjonen til de ulike integrinene varierte etter behandling (Figur 6.21). Størst nedgang ble målt av ITG-β1 etter behandling med MOC31PE. Etter behandling med MOC31PE i kombinasjon med TPMP ble det målt en liten økning i ITG-β1 og ITG-α2 mRNA.

## 6.8 MA11 og MDA-MB-468 gjennomgår apoptose etter behandling med immuntoksin og TPM-derivater

Etter at de ulike analysemetodene viste cytotoxisk effekt ved behandling med MOC31PE, ble cellene analysert med hensyn på apoptosemarkører.



Figur 6.22: PARP kløyvning etter behandling med immuntoksin (IT) og/eller TPMP. To millioner MA11 celler ble sådd i 25 cm<sup>2</sup> flasker og etter 24 timer og 70-80 % konfluens ble de behandlet med MOC31PE 10 ng/ml og/eller TPM-derivater 10  $\mu$ M i 24 timer. Etter endt behandling med ble cellelysat høstet og benyttet i immunblott analyse. Figuren viser PARP kløyvning med inaktiv PARP-fragment på 89 kDa. Det øvre båndet er det aktive PARP (118kDa). (n>3)

Resultatene viser aktiv PARP (118kDa) i ubehandlede celler og PARP kløyvning etter behandling med immuntoksin og ved kombinasjon med TPM-derivater (Figur 6.22). Det er imidlertid vanskelig å si noe om hvorvidt kløyvningen varierer med de ulike TPM-derivatene. Men en synergistisk effekt viser seg å være tilstedet etter behandling med MOC31PE + TPM-derivater. Resultatene hadde vært lettere å tolke hvis vi hadde foretatt en loadingkontroll med  $\alpha$ -tubulin. Dette lot seg ikke gjøre på grunn av klipping av membranen.



Figur 6.23: PARP kløyvning etter behandling med immuntoksin og/eller TPMP. MA11 celler ble dyrket på samme måte som nevnt tidligere og behandlet med MOC31PE 1 ng/ml og TPM-derivater 10  $\mu$ M i 24 timer. Cellelysate ble benyttet til å analysere PARP og  $\alpha$ -tubulin ved immunblotting. ( $n > 3$ )

PARP kløyvning ble påvist etter behandling med MOC31PE og de ulike TPM-derivatene (Figur 6.23). Vi kan se at det er en økning i kløyvning etter behandling bare med MOC31PE enn med TPM-derivatene alene. Kombinasjon av MOC31PE og TPM-derivater sammen synes til å gi større kløyvning. PARP kløyvningen synes å være økt etter behandling med MOC31PE og VN12 sammenlignet med PARP båndene til de andre TPM-derivatene med MOC31PE.

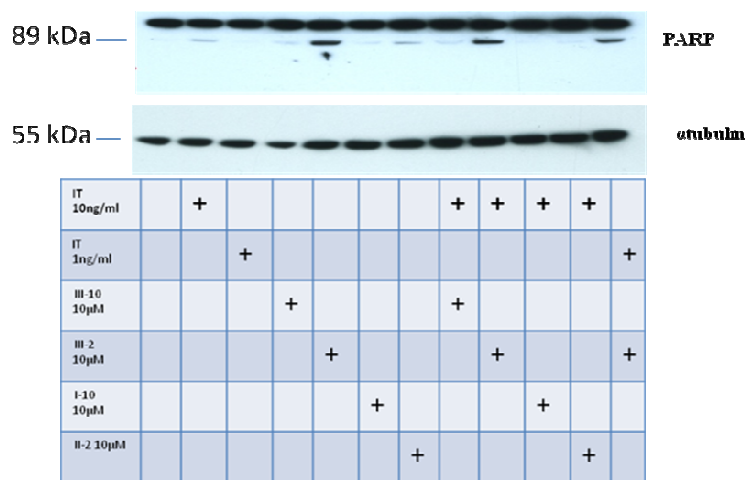
Det har blitt vist at en nedregulering av Mcl-1 genet som koder for et antiapoptotiske protein bidrar til PARP inaktivering [27]. Med bakgrunn i dette ble det analysert om Mcl-1 proteinet var påvirket av behandling med MOC31PE.



IT 10ng/ml				X
IT 1ng/ml			X	
IT 0.1ng/ml		X		

*Figur 6.24: Immunoblotting av Mcl-1 proteinet etter behandling med immuntoksin (IT). To millioner MA11 celler ble sådd ut i 25 cm<sup>2</sup> og etter 24 timer ble de behandlet med MOC31PE 0,1 ng/ml, 1 ng/ml og 10 ng/ml. Etter 24 timers behandlingstid ble cellelysatsat benyttet til immunoblotting. (n=3)*

Nedgang i Mcl-1 proteinet ble påvist etter behandling med MOC31PE, og nedgangen var størst ved behandling med MOC31PE 10 ng/ml (Figur 6.24). Nedgangen var liten etter behandling med MOC31PE 0,1 ng/ml i forhold til de to andre konsentrasjonene. Dette sammensvarer med en minkning i proteinsyntese ved de høyere konsentrasjoner (Figur 6.6). Loadingkontroll uteble på grunn av klipping av PVDF-membranen.

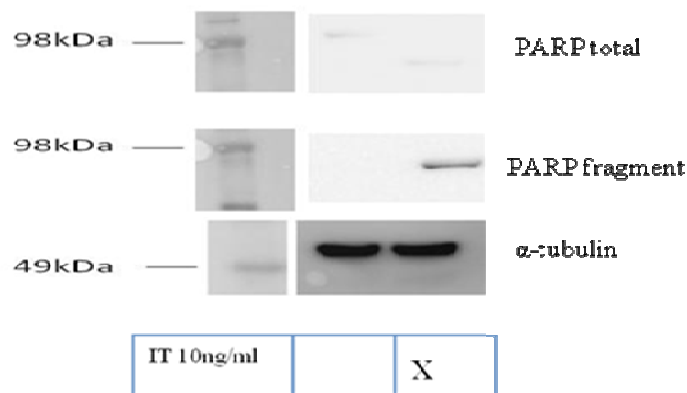


*Figur 6.25: Immunoblotting av PARP protein etter behandling med immuntoksin og/eller TPMP. To millioner MDA-MB-468 celler ble sådd ut i 25 cm<sup>2</sup> flasker og etter 24 timer og 70-80 % konfluens ble de behandlet med MOC31PE 1 ng/ml, 10 ng/ml og ulike TPM-derivater 10 µM i 24 timer. Cellelysate ble laget på samme måte som nevnt tidligere og benyttet til immunoblotting av PARP og α-tubulin. (n>3)*

PARP-kløyvning ble påvist i MDA-MB-468 celler (Figur 6.25). PARP-1 enzymet kløyves når celler dør enten som følge av apoptose eller nekrose [44]. Vi kan også se et PARP fragment på 89 kDa i TPMP III-2 behandlet prøve og også i TPMP III-2 med MOC31PE. Nivået av kløyvningen virker mindre ved behandling med MOC31PE 1 ng/ml enn med MOC31PE 10 ng/ml. To ulike konsentrasjoner av MOC31PE med TPMP III-2 10 µM er undersøkt basert på andre analyser som også viste at TPMP III-2 gir annerledes resultater med hensyn på cytotoxisk effekt enn de andre TPM-derivatene.

Siden det ble vanskelig å tyde om MOC31PE 10 ng/ml alene gir PARP kløyvning i immunoblottingen ovenfor, ble det utført en analyse der antistoffet for PARP total og inaktivt PARP ble benyttet.

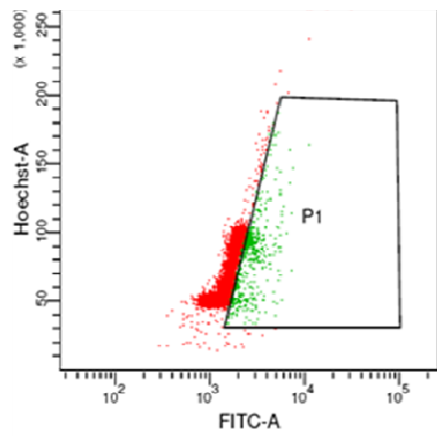




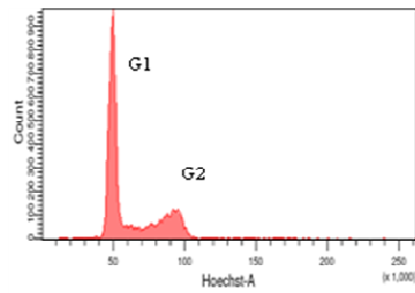
*Figur 6.26: Immunoblotting av PARP protein etter behandling med immuntoksin. To millioner MDA-MB-468 celler ble sådd ut i 25 cm<sup>2</sup> flasker og etter 24 timer ble cellene behandlet med MOC31PE 10 ng/ml. Cellelysate fra prøvene ble benyttet til gelelektroforese og senere benyttet til å se på inaktivt PARP fragment. To ulike PARP antistoffer ble benyttet, det ene detekterer bare inaktivt PARP. På venstre side ligger molekylvekt standarden. (n>3)*

Det ble observert PARP fragment ved å benytte PARP 89kDa antistoffet (Figur 6.26). Kløyvningen er mindre tydelig ved bruk av PARP total antistoffet.

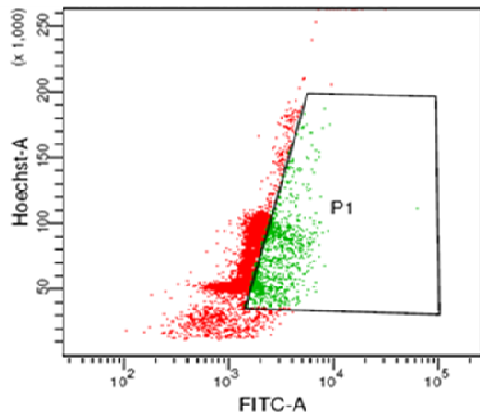
Flowcytometrimetoden ble benyttet for å studere DNA fragmentering som kan finne sted ved apoptose. Celler kan også dø som følge av apoptose uten at DNA-fragmentering finner sted [11]. Dermed kan ikke resultatene fra TUNEL-assay bekrefte om celler dør på grunn av apoptose, men det gir oss et innblikk i hva som skjer etter behandling med immuntoksin. DNA-fragmentering ble studert ved hjelp av TUNEL assay der økt fluorescens intensitet fra fluorokromet FITC indikerer økt DNA fragmentering. Analysemetoden gir oss også mulighet til å se på om immuntoksin behandling påvirker celsyklusen. MDA-MB-468 og MA11 celler ble behandlet med immuntoksin og ulike TPM-derivater i 24 timer. MA11 ble benyttet som en positiv kontroll da tidligere analyser har vist DNA-fragmentering etter behandling med immuntoksin.



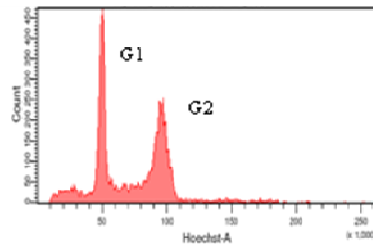
Ktr



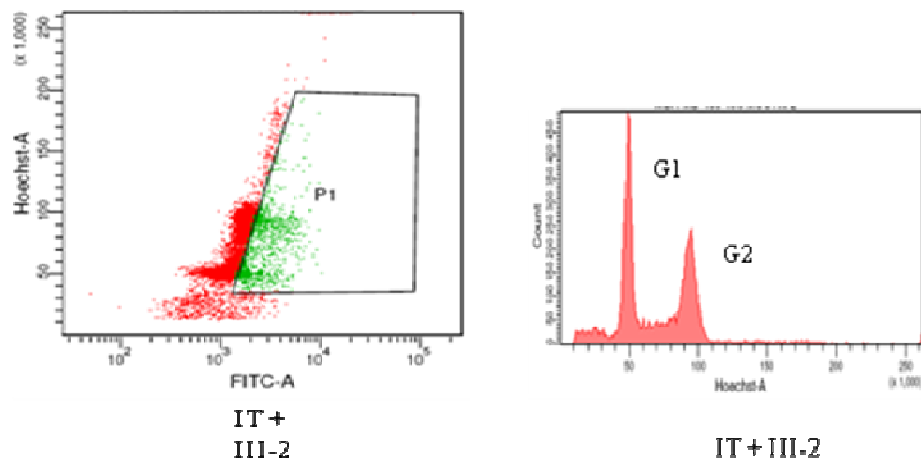
Ktr



III-2

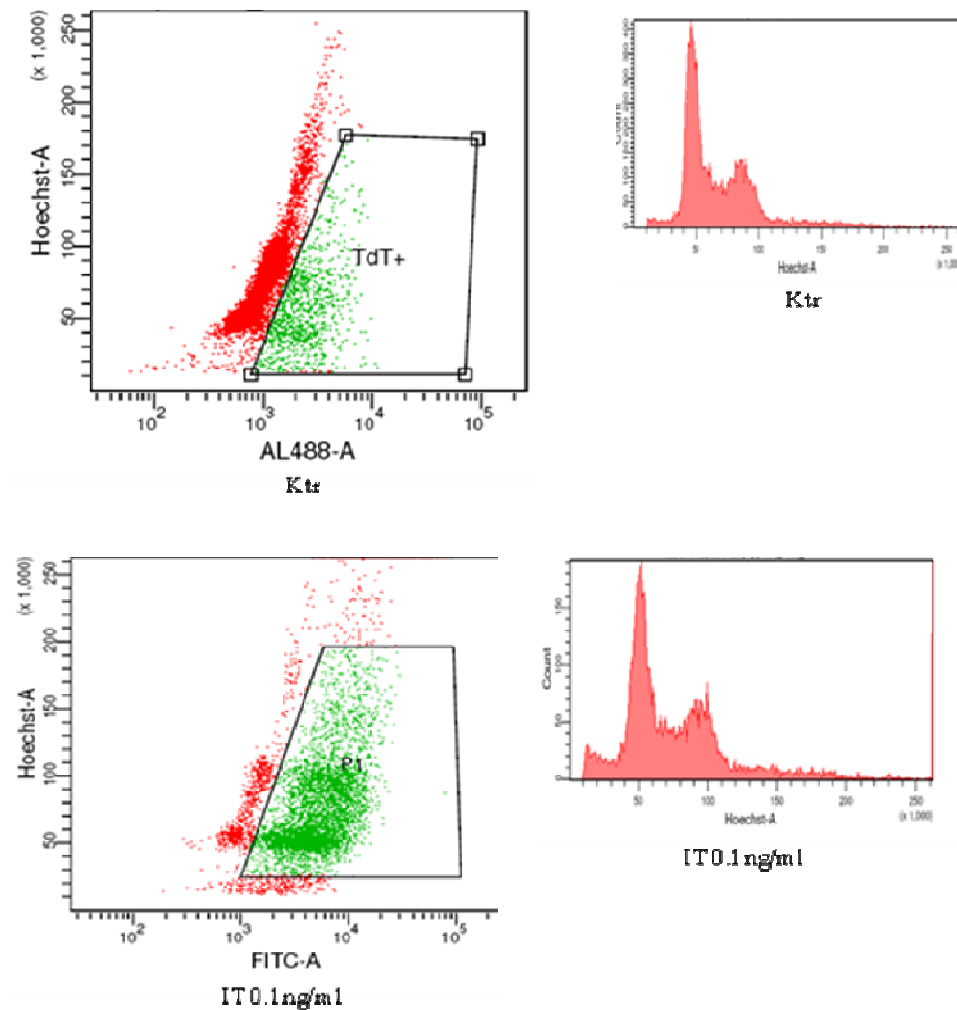


III-2



Figur 6.27: Flowcytometri etter behandling med immuntoksin (IT) og/eller TPMP. To millioner MDA-MB-468 celler ble sådd ut i 25 cm<sup>2</sup> flasker og etter 24 timer og 70-80 % konfluens ble de behandlet med MOC31PE 1 ng/ml og TPMP III-2 10  $\mu$ M i 24 timer. Cellene ble så gjort i stand til TUNEL flowcytometri ved at frie DNA-ender ble merket med fluorokrom og absorbansen ble målt. (n=2)

Ved behandling med TPMP III-2 10  $\mu$ M ser vi en økning i G<sub>2</sub> topp (Figur 6.27). Denne toppen påvirkes ikke etter behandling med MOC31PE 10 ng/ml. FITC-intensiteten endrer seg ved en kombinasjonsbehandling med immuntoksin og TPMP III-2 i forhold til kontrollen.



Figur 6.28: Flowcytometri etter behandling med immuntoksin (IT). MA11 celler ble behandlet og analysert ved hjelp av TUNEL assay som MDA-MB-468 celler. (n=2)

MOC31PE behandling forårsaker en mer uordnet og bredere topp i forhold til kontrollen med ubehandlede MA11 celler (Figur 6.28). Antall celler er også redusert i behandlede prøven, noe som kan tyde på den antiproliferative effekten til MOC31PE. FITC-intensiteten er også bemerkelsesverdig økt i behandlede prøven, noe som kan tyde på økt DNA fragmentering i forhold til ubehandlede prøve.

Tabell II: Prosent (%) DNA-fragmentering etter behandling med MOC31PE 1 ng/ml og TPM-derivater 10  $\mu$ M.

	MDA-MB-468	MA11
<b>Ktr</b>	0.5	4.9
<b>IT</b>	1.3	72.4
<b>III-10</b>	2.4	4.7
<b>III-2</b>	3.4	22.5
<b>I-10</b>	0.7	7.4
<b>II-2</b>	1.9	5.7
<b>IT + III-10</b>	2.6	79.4
<b>IT + III-2</b>	3.2	77.7
<b>IT + I-10</b>	0.6	79.1
<b>IT + II-2</b>	0.8	73.8

*Figur 6.29: Resultater av prosent DNA fragmentering etter behandling med immuntoksin (IT) og TPM-derivater. MDA-MB-468 og MA11 celler ble behandlet med MOC31PE 1 ng/ml og ulike TPM-derivater 10  $\mu$ M i 24 timer.*

Resultatene fra TUNEL-assay varierte mellom de to ulike cellelinjene (Figur 6.29). MOC31PE 1 ng/ml ga mye høyere DNA-fragmentering i MA11 celler i motsetning til MDA-MB-468 celler. Det var ikke mye økning i DNA fragmentering etter behandling med de ulike TPM-derivatene alene. TPMP III-2 viste noe høyere prosent av DNA fragmentering i MA11 celler.

## **7. Diskusjon**

På 1970-tallet trodde mange at immuntoksin (IT) var løsningen på et effektivt målrettet kreftspesifikt medikament fordi det spesifikt angriper kreftceller og etterlater friske celler [28]. Den kliniske nytten av IT ble dessverre hemmet av en kraftig anti-IT antistoffrespons som nøytraliserte IT og kunne gi til dels alvorlige bivirkninger hos pasienter, noe som sterkt har begrenset klinisk bruk av IT. I tidligere prekliniske studier har det blitt vist at immuntoksiner brukt ved vår avdeling (425.3PE, BM7PE, 9.2.27PE) inhiberer proteinsyntesen og induserer celledød i ulike kreftcellelinjer, [38], [39], [45] samt hemmer tumorvekst og metastasering i humane tumormodeller [27], [46]. Dessuten har to kliniske Fase I studier med MOC31PE blitt utført på Radiumhospitalet med lovende resultater. Det er av klinisk relevans at forskning utføres for å maksimere immuntoksin-cytotoksiske effekter, gjennom å sensitivisere kreftcellen for IT. Jeg har i denne oppgaven undersøkt effekten av MOC31PE sammen med andre potensielle antikreftagenser. For å kartlegge virkningsmekanismen av et legemiddel og hvordan det påvirker aktuelle cellelinjer, må man benytte seg av ulike analysemetoder. Ut fra tidligere data og kjente analysemetoder for å studere celledød i kreftceller, har de metodene som har vært egnet for denne oppgaven blitt valgt.

Siden trippelnegativ brystkreft (TNBC) er utfordrende å behandle, var det interessant å studere om målrettet terapi med immuntoksin og andre potensielle antikreft-agenser kunne være aktuell behandling for denne kreftcelletypen. Det er kjent at trippelnegativ brystkreft har overuttrykk av epitelcelle adhesjonsmolekyl (EpCAM) [47], og at denne egenskapen er korrelert med dårlig prognose og overlevelsestid ved brystkreft [48]. Vårt immuntoksin MOC31PE binder seg spesifikt til EpCAM antigenet, og kan derfor benyttes som målrettet terapi for denne krefttypen.

Siden det ikke foreligger noen studier på TNBC cellelinjer og effekt av immuntoksin, valgte vi å studere MDA-MB-468 med samme analysemetoder som tidligere gjort på andre kreftcellelinjer og med nye metoder som passet for denne oppgaven. Omfanget av denne oppgaven og tidsaspektet har begrenset hva som har vært mulig å produsere, men de lovende resultatene kan bekreftes med flere typer analyser og ved å analysere flere markører involvert i celledød.

Det har i oppgaven blitt verifisert at MA11 celler dør som følge av MOC31PE immuntoksin behandling, og dette ble verifisert ved å se på celleviabilitets analyse (MTS-analyse). Metoden

kunne derimot ikke benyttes til MDA-MB-468 celler fordi ubehandlede kontrollceller ikke viste noen fargeendring ved tilsetning av MTS reagens. Det kan være flere årsaker til dette, blant annet at opptaksmekanismen av MTS i levende celler ikke er optimal, men det er lite sannsynlig.

Årsaken er mest sannsynlig at MTS ikke reduseres til formazan av NADPH/NADH på grunn av dehydrogenase aktivitet i disse metabolsk aktive celler som eventuelt kan forårsakes av genetiske forandringer i cellene.

For å videre undersøke celleproliferasjonen etter immuntoksin-behandling i MA11 celler, ble det benyttet en IncuCyte maskin. I motsetning til MTS-analyse, som en endepunktanalyse, kan man med IncuCyte følge med på vekstmønsteret mens cellene vokser under normale betingelser.

Visuelle observasjoner gjør det også mulig å se på endret morfologi etter behandling med cytotoksiske agenser. En reduksjon i antall celler ble observert etter behandling med immuntoksin, og konfluensen i brønnene begynte å avta etter 40 timers behandling med immuntoksin. Grafen for MOC31PE behandlet celler viste noen variasjoner fra punkt til punkt, og i begynnelsen av behandlingen steg celleproliferasjonen av behandlede celler i forhold til ubehandlede celler. Dette kan skyldes at kreftceller først øker sin proliferasjons kapasitet i respons på cytotoksisk behandling for å prøve å overleve. Kreftcellene må til slutt gi opp forsøket på å overleve og dør som følge av immuntoksinbehandlingen.

For å finne ut om immuntoksin utøver cytotoksisk effekt i MDA-MB-468 celler, ble det utført en celleproliferasjonsanalyse ved å benytte IncuCyte maskin, som verifiserte at immuntoksin også påvirker celleproliferasjonen i disse cellene. Denne metoden ble benyttet som alternativ celleviabilitetsanalyse for MDA-MB-468 celler ettersom den mest brukte metoden, MTS-assay, ikke fungerte med disse cellene. Begrensninger med IncuCyte-maskinen kan være døde celler som forstyrrer konfluensmålingen og som dermed kan gi noe unøyaktige resultater. Metoden egner seg ikke for alle celler, det vil for eksempel være vanskelig å måle konfluens på celler som har et flatt utseende og som dermed kan bli vanskelig å detektere i mikroskopet og kamera. Maskinen er ny i avdelingen slik at det har vært liten tid til å optimalisere celleanalyser og finne ut hvordan ulike celletyper egner seg til denne metoden.

Proteinsyntesehemming har blitt bekreftet i brystkreftcellelinjene MDA-MB-468 og MA11.

Brystkreftcellelinjen MA11 har blitt brukt som en referanse siden det tidligere har blitt bekreftet

proteinsyntesehemming i MA11 celler etter behandling med ulike immuntoksiner (Risberg et al, 2011 Journal of Immunotherapy (in press)), [27], [39], [46]. Jeg har også vist at MOC31PE mer effektivt hemmer proteinsyntesen i MA11 celler enn i MDA-MB-468 celler. Det kreves omtrent 10 ganger lavere immuntoksinkonsentrasjon til å hemme proteinsyntesen i MA11 celler i forhold til i MDA-MB-468 celler. Dosen for å inhibere proteinsyntesen med 50 % ID<sub>50</sub> var 0,7 ng/ml for MA11 og 5 ng/ml for MDA-MB-468. I oppgaven ble det også påvist en økning i fosforyleringen av  $\alpha$ -subenheten i initieringsfaktoren (eIF-2 $\alpha$ ) både i MA11 celler og i MDA-MB-468 celler etter behandling med MOC31PE. Denne fosforyleringen av  $\alpha$ -subenehten kan føre til at proteinsyntesen hemmes og kan resultere i apoptose [49].

Immuntoksinbehandling viste ingen effekt på cellyklusen i verken MDA-MB-468 eller MA11 celler. Det ble observert noe lavere celledtall i IT-stimulerte MA11 celler, noe som kan verifisere den antiproliferative effekten av immuntoksin på disse cellene.

Med synergistisk effekt menes det at to eller flere legemidler sammen gir større effekt enn summen av hvert legemiddel alene. Det er i denne oppgaven funnet synergistiske cytotoksiske effekter av MOC31PE og ulike TPM-derivater, både i MDA-MB-468 og i MA11 celler. Det ble også observert synergistisk proteinsyntesehemming etter behandling med immuntoksin og TPM-derivater. De ulike TPM-derivatene alene ga liten effekt på proteinsyntesen, men kombinert med immuntoksin ble proteinsyntesen redusert. Særlig synergistisk effekt var det av TPMP III-10 og TPMP I-10 sammen med MOC31PE.

Resultatene bekrefter at MOC31PE påvirker MA11 og MDA-MB-468 celler ved å inhibere proteinsyntesen og induserer celledød, og at det kan muligens brukes til målrettet kreftbehandling i fremtiden. For å analysere om disse dataene kan brukes videre i forskning, må det gjøres flere ulike studier både *in vitro* og *in vivo*.

For å studere om en lav immuntoksinkonsentrasjon sammen med TPMP I-10 kan utøve synergistisk effekt på celleviabilitet, ble det utført en MTS analyse med MOC31PE 0,1 ng/ml og TPMP I-10 10  $\mu$ M. Det interessante funnet i denne analysen var at MOC31PE 0,1 ng/ml alene ga minimal cytotoxicitet (omtrent 10 %), men kombinert med TPMP ble celleviabiliteten redusert med omtrent 35 %. Dette viser at lave MOC31PE doser kan egne seg til synergistisk behandling med TPM-derivater. Det er viktig å finne en behandling med så lav konsentrasjon av de ulike



medikamentene som mulig, men med maksimal farmakologisk effekt, slik at bivirkninger kan reduseres og at pasienter kan bli bedre.

Det er kjent at ulike celledødsprosesser kan føre til endret ATP-nivå [50], og ATP-nivået ble i denne oppgaven analysert etter behandling med immuntoksin og/eller TPM-derivater. Det ble funnet redusert ATP-nivåer ved kombinasjonsbehandling med immuntoksin og TPM-derivater, spesielt IT sammen med TPMP III-10 og TPMP I-10 i begge cellelinjene, tilsvarende som proteinsyntese-analysen.

De ulike analysemetodene nevnt ovenfor gir tilnærmet like resultater, og korrelerer med hverandre med tanke på den cytotoksisk effekten av immuntoksin alene og synergistiske celledødseffekten av immuntoksin og TPM-derivater sammen.

For å få et helhetlig bilde av prosesser som fører til celledød, er det viktig å se på uttrykket til ulike markører for celledød. Derfor valgte vi ut ulike proteiner som er av interesse ved apoptose/nekrose, og har påvist PARP kløyving og nedregulering av Mcl-1 proteinnivået. Det har tidligere blitt vist at nedregulering av antiapoptotiske proteinet Mcl-1 er involvert i celledød i brystkreftceller [51], og det har også blitt vist en nedregulering av proteinet etter behandling med et annet immuntoksin (425.3PE) MA11 celler [27]. Mcl-1 proteinet har kort halveringstid [52], og fravær av proteinet fremmer apoptose i celler [53]. En PARP kløyvning i tillegg til Mcl-1 nedgang forsterker teorien om at cellene dør som følge av apoptose. Immunblott analysene har gitt innblikk i apoptoseprosessen i MA11 og MDA-MB-468.

I startfasen av oppgaven var det vanskeligheter med å påvise PARP-fragmentet (89 kDa) i MDA-MB-468 celler. Dette medførte en del forsinkelser i studiene da tre ulike PARP-antistoffer ble utprøvd før PARP-fragment ble påvist i MDA-MB-468 celler. Dette problemet var ikke så uttalt i MA11 celler, og det kan tyde på at MA11 celler har mer PARP kløyvning ved immuntoksinbehandling. Økt DNA-fragmentering i MA11 celler ved behandling med MOC31PE viser også at disse cellene er mer sensitive for MOC31PE enn MDA-MB-468 cellene er. Det har også vært problemer med å detektere andre proteiner involvert i celledød, som påvisning av aktivert caspase-3. Generelt har mye tid gått til å optimalisere Western analysen på grunn av problemer med blant annet primært antistoff, sekundært antistoff, redusert overføring av proteiner fra gel til PVDF-membran og fremkallingsproblemer.

Vi kan fra resultatene si noe om celledødsprosessen som MDA-MB-468 og MA11 gjennomgår etter påvirkning av immuntoksin og/eller TPM-derivater. Resultatene indikerer at cellene dør som følge av apoptose, men det vil også være interessant å finne ut om nekrose kan finne sted i disse cellelinjene ved behandling med immuntoksin. Det har tidligere blitt hevdet at apoptose er det ideelle målet for antikreftbehandling. Det er en ``ryddig`` prosess som ikke påvirker nærliggende celler, og der kreftcellene dør uten å aktivere immunsystemet. På den andre siden har vi nekrose der det vil lekke ut cellekomponenter slik at immunsystemet aktiveres [54]. Nyere forskning har vist at nekrose kan være det ønskede målet for antikreft terapi [55]. Det er kjent at en kreftcelle kan proliferere og gi grunnlag til en svulst når cellen klarer å unnsnippe immunrespons. Ved å aktivere immunsystemet vil vi altså klare å rekruttere kroppens eget forsvar mot kreftcellen i tillegg til direkte påvirkning av kreftcellen.

Analysene fra IncuCyte viste en MOC31PE induisert nedgang i cellevekst, samtidig som en synergistisk cytotoksitet også kunne bekreftes med TPMP I-10 i MA11 celler. Dette kan tyde på at behandling med immuntoksin mer enn 24 timer, som var behandlingstiden i oppgaven, hadde gitt mer celledød i våre analyser. Eller at en lavere konsentrasjon med immuntoksin hadde gitt samme resultat etter omtrent 40 timer som med høyere konsentrasjon immuntoksin etter 24 timers behandling. Dette kan være noe å ta hensyn til om man skal anvende resultatene klinisk, i forhold til bivirkninger og toksisitet. En lavere konsentrasjon av immuntoksin kan gi mindre bivirkninger for pasienter.

Etter behandling med TPMP III-2 ble det registrert en opphopning av MDA-MB-468 celler i G<sub>2</sub>-fase.. Den kreftcelle drepende effekten til TPMP III-2 er ved å indusere cellesyklusarrest ved G<sub>1</sub> – eller G<sub>2</sub>/M fase [31]. Denne effekten av TPMP III-2 var derimot ikke observert i MA11 celler. Men i disse cellene ble det observert en økt DNA fragmentering (22,5 %) med TPMP III-2 alene. Disse resultatene kan tyde på at TPMP III-2 har annerledes opptak i disse cellelinjene i forhold til de andre TPM-derivatene.

For at kreftceller skal proliferere, er de avhengig av biosyntesen av enumettede fettsyrer [56]. Fettsyrene er nødvendig for at behovet for fosfolipider øker som følge av økt membran oppbygning, og det hastighetsbestemmende enzymet i denne prosessen er stearoyl-CoA desaturase (SCD) [57]. Økt fettsyresyntese har blitt bekreftet i flere kreftformer, blant annet i

brystkreft [58]. Det har også blitt vist at nedgang i SCD uttrykk kan redusere kreftcelle proliferasjon og *in vitro* invasjon [59]. Våre RT-PCR-analyser viste lite nedgang i SCD genuttrykket i MA11 celler etter 24 timers behandling med 0,1 ng/ml MOC31PE. Dette var ikke i overensstemmelse med det vi hadde forventet. Tidligere studier gjort i gruppen viser en markant nedgang av SCD-uttrykk etter behandling med et annet immuntoksin (425.3PE) (Risberg et al, 2011 Journal of Immunotherapy (in press)). Grunnen til den lave nedgangen i SCD-uttrykket kan være den lave konsentrasjonen av MOC31PE (0,1 ng/ml) og denne konsentrasjonen ble valgt med bakgrunn i den høye celledødseffekten som andre konsentrasjoner ga. For høy celledød vil føre til RNA degradering, noe som kan gi feil konklusjon.

Genuttrykket til SCD gikk ned etter behandling med MOC31PE og TPMP I-10 i MDA-MB-468 celler. Som forventet ga kombinasjonen av immuntoksin og TPM-derivat noe mer nedgang i SCD-genuttrykk. I tillegg så vi også en tilsvarende nedgang i SREBP1-uttrykket. SREBP1 er en transkripsjonsfaktor som regulerer genekspresjonen til SCD og andre gener som er viktig i lipid – og fettsyremetabolismen [60].

Genekspresjonen til MET, ITG- $\beta$ 1 og ITG- $\alpha$ 2 ble analysert fordi endret ekspresjon av disse genene ble observert etter behandling av MDA-MB-468 med et annet immuntoksin (BM7PE) (Merete Thune Wiiger, upublisert). Resultatene bekreftet de tidlige funnene hvor MET genekspresjonen økte og ITG- ekspresjonene varierte etter behandling med immuntoksin. MET er et protoonkogen som ved mutasjon kan endre seg til et onkogen [61], og en økt genekspresjon av MET kan komme av at celler prøver å overleve cytotoxisk behandling.

Resultatene i denne oppgaven var like på noen og ulike på andre områder for cellelinjene MA11 og MDA-MB-468. Det ble påvist cytotoxisitet som følge av immuntoksin behandling, der effekten var konsentrasjonsavhengig både innad cellelinjene og mellom de to cellelinjene. MOC31PE viste seg å være nesten 10 ganger mer potent i MA11 celler i forhold til MDA-MB-468 celler. Det kan være ulike årsaker til dette, som ulikt opptak av immuntoksin og TPM-derivater. Resultatene fra MTS-analysen og ATP-analysen og de varierende effekter av TPM-derivater kan tyde på at mitokondriene fungerer annerledes i MDA-MB-468 celler enn i MA11 celler. Det vil videre være interessant å studere mitokondriefunksjonen i MDA-MB-468 celler

sammenlignet med MA11 celler for å finne ut om mitokondriene spiller en rolle i forhold til de ulike resultatene i denne oppgaven.

## **8. Konklusjon**

Det har under denne oppgaven blitt undersøkt om immuntoksinet MOC31PE har en celledødseffekt i brystkreftcellelinjene MA11 og MDA-MB-468. Det ble påvist at immuntoksinet hadde cytotoksisk effekt på kreftceller ved å indusere proteinsyntesehemming, ved induksjon av apoptose, redusert celleviabilitet, redusert proliferasjon og redusert ATP-nivå. Disse funnene er i samsvar med tidligere funn innenfor immuntoksin feltet i ulike kreftcelletyper.

Det har også blitt verifisert at celledrepende effekten i MA11 og MDA-MB-468 øker ved en kombinasjon med immuntoksin og småmolekylære TPM-derivater. Effekten var spesielt bemerkelsesverdig ved kombinasjon av immuntoksin og TPMP I-10, både i MA11 og MDA-MB-468 celler.

Disse funnene i oppgaven har bidratt til økt forståelse rundt den cytotoksiske effekten av immuntoksin i trippelnegativ- (MDA-MB-468) og dobbelnegativ- (MA11) brystkreftceller, samt vist at den totale celledødseffekten øker ved å kombinere immuntoksin med småmolekylære TPM-derivater.

## 9. Videre planer

Tiden har vært en begrensning for hva som har vært mulig å studere. Mange nye spørsmål har dukket opp under arbeidet, og noen av dem kan være interessant å studere i fremtiden:

- TPM-derivater er en stor gruppe lovende småmolekylære antikreftagens. Det vil være interessant å kombinere flere ulike typer TPM-derivater med immuntoksin og kombinere immuntoksin sammen med TPM-derivat med ciklsporin (CsA). I en nylig avsluttet Fase I utprøving (IT ogCsA), fant vi at den begrensende bivirkning av systemisk repeterende IT-behandling nå er løst. CsA hemmer effektivt anti-IT antistoff respons ved repetert IT-behandling i pasienter.
- Immuntoksin har allerede vist lovende resultater i flere ulike kreftceller. Basert på at trippelnegativ brystkreft er en aggressiv krefttype med få behandlingsmuligheter, vil det være interessant å studere om immuntoksin har lik god effekt i ulike trippelnegative brystkreftcellelinjer for å se om det er generelle mønster i virkningsmekanismen.
- De lovende resultatene funnet i denne oppgaven kan brukes videre for å utføre *in vivo* studier og studere om immuntoksin i kombinasjon med TPM-derivater kan gi redusert tumorvekst i forsøksdyr og/eller hemme spredning av kreftceller (metastasering).

## 10. Referanser

1. kreftforeningen.no. *Kreftforeningen*. 2011 [cited 2011 26.04.2011]; Available from: <http://www.kreftforeningen.no/>.
2. NationalCancerInstitute. *National cancer institute*. 2011 [cited 2011 02.03]; Available from: <http://www.cancer.gov/>.
3. folkehelseinstituttet.no. *Folkehelseinstituttet*. 2011 [cited 2011 05.01]; Available from: <http://www.fhi.no/>.
4. legemiddelhåndboka.no. *Norsk legemiddelhåndbok*. 2011 [cited 2011 20.04]; Available from: <http://www.legemiddelhandboka.no/>.
5. nhi.no. *Norsk helseinformatikk*. 2011 [cited 2010 17.10]; Available from: <http://nhi.no/forside/>.
6. Breastcancer.org. *Breastcancer.org*. 2011 [cited 2011 26.04]; Available from: <http://www.breastcancer.org/>.
7. Dawood, S., *Triple-negative breast cancer: epidemiology and management options*. Drugs, 2010. **70**(17): p. 2247-58.
8. Dent, R., et al., *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4429-34.
9. Sciencedaily.com. *Sciencedaily*. 2011 [cited 2011 26.04]; Available from: <http://www.sciencedaily.com/>.
10. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
11. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell death and differentiation, 2009. **16**(1): p. 3-11.
12. celldeath.de. *ApoReview, an introduction to apoptotic cell death*. 2011 [cited 2011 27.04]; Available from: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>.
13. de Bruin, E.C. and J.P. Medema, *Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response*. Cancer treatment reviews, 2008. **34**(8): p. 737-49.
14. Lockshin, R.A. and C.M. Williams, *Programmed cell death--II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms*. Journal of Insect Physiology, 1964. **10**(4): p. 643-649.
15. McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, *Mitochondria: more than just a powerhouse*. Current biology : CB, 2006. **16**(14): p. R551-60.
16. Burz, C., et al., *Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets*. Acta Oncol, 2009. **48**(6): p. 811-21.
17. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. Oncogene, 0000. **25**(34): p. 4798-4811.
18. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4798-4811.
19. MacFarlane, M. and A.C. Williams, *Apoptosis and disease: a life or death decision*. EMBO Rep, 2004. **5**(7): p. 674-8.
20. Herceg, Z. and Z.Q. Wang, *Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death*. Mutation research, 2001. **477**(1-2): p. 97-110.
21. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell death and differentiation, 2005. **12**(S2): p. 1463-1467.

22. Liu, P.V., *Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis, 1974. **130** Suppl(0): p. S94-9.
23. Iglewski, B.H., P.V. Liu, and D. Kabat, *Mechanism of action of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo*. Infection and immunity, 1977. **15**(1): p. 138-44.
24. Iglewski, W.J., *Cellular ADP-ribosylation of elongation factor 2*. Molecular and cellular biochemistry, 1994. **138**(1-2): p. 131-3.
25. Hafkemeyer, P., et al., *Apoptosis induced by Pseudomonas exotoxin: a sensitive and rapid marker for gene delivery in vivo*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(6): p. 923-34.
26. Risberg, K., Ø. Fodstad, and Y. Andersson, *Immunotoxins: A Promising Treatment Modality for Metastatic Melanoma?* The Ochsner Journal, 2010. **10**(3): p. 193-199.
27. Andersson, Y., S. Juell, and Ø. Fodstad, *Downregulation of the antiapoptotic MCL-1 protein and apoptosis in MA-11 breast cancer cells induced by an anti-epidermal growth factor receptor–Pseudomonas exotoxin a immunotoxin*. International Journal of Cancer, 2004. **112**(3): p. 475-483.
28. Kreitman, R.J., *Immunotoxins for targeted cancer therapy*. AAPS J, 2006. **8**(3): p. E532-51.
29. Garcia-Caballero, T., et al., *MOC-31/Ep-CAM immunoreactivity in Merkel cells and Merkel cell carcinomas*. Histopathology, 2003. **43**(5): p. 480-4.
30. Munz, M., P.A. Baeuerle, and O. Gires, *The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling*. Cancer research, 2009. **69**(14): p. 5627-9.
31. Palchaudhuri, R., V. Nesterenko, and P.J. Hergenrother, *The Complex Role of the Triphenylmethyl Motif in Anticancer Compounds*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(31): p. 10274-10281.
32. lgcstandards-atcc.org. *lgcstandards-atcc.org*
- 2011 [cited 2011 09.05.2011]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-132&Template=cellBiology>.
33. Rye, P.D., et al., *Brain metastasis model in athymic nude mice using a novel MUC1-secreting human breast-cancer cell line, MA11*. Int J Cancer, 1996. **68**(5): p. 682-7.
34. Micci, F., M.R. Teixeira, and S. Heim, *Complete cytogenetic characterization of the human breast cancer cell line MA11 combining G-banding, comparative genomic hybridization, multicolor fluorescence in situ hybridization, RxFISH, and chromosome-specific painting*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2001. **131**(1): p. 25-30.
35. essenbioscience.com. *IncuCyte Overview*. 2011 [cited 2011 13.05.2011]; Available from: <http://www.essenbioscience.com/products.html>.
36. Abcam.com. *Picture of a flow cytometer*. 2011 [cited 2011 26.04]; Available from: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11446>.
37. Puck, T.T., P.I. Marcus, and S.J. Cieciura, *Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer*. The Journal of experimental medicine, 1956. **103**(2): p. 273-83.
38. Risberg, K., O. Fodstad, and Y. Andersson, *Anti-melanoma activity of the 9.2.27PE immunotoxin in dacarbazine resistant cells*. J Immunother, 2010. **33**(3): p. 272-8.
39. Andersson, Y., O. Engebraaten, and O. Fodstad, *Synergistic anti-cancer effects of immunotoxin and cyclosporin in vitro and in vivo*. British journal of cancer, 2009. **101**(8): p. 1307-15.
40. Orozco, A.F. and D.E. Lewis, *Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma*. Cytometry Part A, 2010. **77A**(6): p. 502-514.
41. Aktas, H., et al., *Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, phosphorylation of eIF2alpha, and sustained inhibition of translation initiation mediate the anticancer effects of clotrimazole*.



- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(14): p. 8280-5.
42. Wek, R.C., H.Y. Jiang, and T.G. Anthony, *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 1): p. 7-11.
  43. Israelsen, W.J. and M.G. Vander Heiden, *ATP Consumption Promotes Cancer Metabolism*. Cell, 2010. **143**(5): p. 669-671.
  44. Gobeil, S., et al., *Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases*. Cell death and differentiation, 2001. **8**(6): p. 588-94.
  45. Risberg, K., O. Fodstad, and Y. Andersson, *The melanoma specific 9.2.27PE immunotoxin efficiently kills melanoma cells in vitro*. Int J Cancer, 2009. **125**(1): p. 23-33.
  46. Andersson, Y., et al., *AMP-activated protein kinase protects against anti-epidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin A immunotoxin-induced MA11 breast cancer cell death*. Molecular cancer therapeutics, 2006. **5**(4): p. 1050-9.
  47. Schmidt, M., et al., *Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2008. **14**(18): p. 5849-55.
  48. Gastl, G., et al., *Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival*. Lancet, 2000. **356**(9246): p. 1981-2.
  49. Clemens, M.J., *Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis*. Prog Mol Subcell Biol, 2001. **27**: p. 57-89.
  50. Lieberthal, W., S.A. Menza, and J.S. Levine, *Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells*. The American journal of physiology, 1998. **274**(2 Pt 2): p. F315-27.
  51. Tong, W.-G., X.-Z. Ding, and T.E. Adrian, *The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2002. **296**(4): p. 942-948.
  52. Kozopas, K.M., et al., *MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(8): p. 3516-20.
  53. Moulding, D.A., et al., *Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1756-63.
  54. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 663-9.
  55. *How to improve the immunogenicity of chemotherapy and radiotherapy*. Cancer and Metastasis Reviews, 2011. **30**: p. 71-82.
  56. Minville-Walz, M., et al., *Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 expression induces CHOP-dependent cell death in human cancer cells*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14363.
  57. Scaglia, N. and R.A. Igal, *Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis*. International journal of oncology, 2008. **33**(4): p. 839-50.
  58. Yang, Y.A., et al., *Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c*. Experimental cell research, 2003. **282**(2): p. 132-7.
  59. Scaglia, N. and R.A. Igal, *Stearoyl-CoA Desaturase Is Involved in the Control of Proliferation, Anchorage-independent Growth, and Survival in Human Transformed Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(27): p. 25339-25349.

60. Hoashi, S., et al., *Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle*. Mammalian Genome, 2007. **18**(12): p. 880-886.
61. Schmidt, L., et al., *Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas*. Nat Genet, 1997. **16**(1): p. 68-73.

## 11. Vedlegg

### Cellekultur:

- RPMI-1640 without L-glutamine (Roswell Park Memorial Institute) (LONZA, Belgium)
- Leibovitz's without L-glutamine (Roswell Park Memorial Institute) (LONZA, Belgium)
- Glutamax (LONZA, Belgium)
- HEPES (LONZA, Belgium)
- FBS (Foetal bovine serum) (Sigma-Aldrich)
- Trypsin/EDTA (Ethylendiaminetetra-acetic acid disodium salt) (LONZA, Belgium)

### Proteinmåling:

Standard kurve A-F med bovint serum albumin (BSA) (Utgangskonsentrasjon av stockløsning av BSA er 2 mg/ml)

Standard	Konsentrasjon ( µg/ml)	Volum av BSA	Volum vann
A	1500	375 µl stock BSA	125 µl
B	1000	325 µl stock BSA	325 µl
C	750	175 µl av A	175 µl
D	500	325 µl av B	325 µl
E	250	325 µl av D	325 µl
F	125	325 µl av E	325 µl

### Lyseringsløsning

- 0.5 ml SDS (10 %)
- 0.5 ml Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (10mM)
- 50 µl Tris (pH 7.5)

### **Immunblott:**

#### Loading farge

- NuPAGE<sup>®</sup>LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen)
- NuPAGE Sample Reducing Agent (10X) (Invitrogen)

#### Molekylvekt markør

- SeeBlue<sup>®</sup>Plus2 Prestained Standard (1X) (Invitrogen)

#### PVDF-membran

- Immobilon-PVDF membrane, med porestørrelse 0,45 µm (Milipore, USA)

#### Running buffer

- NuPAGE<sup>®</sup>MES SDS (Invitrogen)

#### Transfer buffer (1X)

- Glycin (14.4g)
- Tris (3.63g)
- 200 ml Metanol
- H<sub>2</sub>O (til 1000 ml)

#### Amidoblack (1L)

- 1 g Naphtol-Blue-Black
- 450 ml metanol
- 100 ml Eddiksyre
- 450 ml H<sub>2</sub>O

#### Avfargingsløsning (1L)

- 900 ml metanol
- 80 ml H<sub>2</sub>O
- 20 ml Eddiksyre

#### TBST-buffere

- TBST 0,05 %: 0,5 M NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 0,05 % Tween-20
- TBST 0,05 %: 0,15 M NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 0,05 % Tween-20
- TBST 0,1 %: 0,15 M NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 0,1 % Tween-20

#### Hybridisering

- Tørrmelk (non-fat) Tine, Norge
- BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich, USA)

#### Protein detektering:

- SuperSignal ®West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Science)
- Kodak medical X-ray Film (USA)
- G-Box fremkallingsmaskin (Syngene)

**MTS analyse:**

- CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non radioactive (Promega, USA)
- Plateleser: Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter (Finland)

**ATP analyse:**

- Høsteløsning inneholder
  - 100 µl Tris (pH 7.5, 100mM)
  - EDTA (4mM)
- ATP Bioluminiscence Assay Kit CLS II (USA) inneholder:
  - Luciferase Reagent
- Modulus microplate (Turner Biosystems)

**Proteinsyntese analyse:**

- Leucine: L-[3,4,3-<sup>3</sup>H(N)]- (PerkinElmer)
- MEM (Minimum Essential Medium) EARLE'S without leucine and glutamine (Invitrogen)
- Trichloroacetic Acid (Sigma Aldrich)
- KOH
- Tri-Carb 2100TR Liquid Scintillation Analyzer (Packard Bioscience, USA)

**Flowcytometri:**

- Triton TX100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Tørrmelk (non-fat) Tine, Norge)
- Terminal Transferase recombinant TdT kit (Roche Diagnostics, Germany) inneholder:

- 5 x Reaction buffer
- $\text{CoCl}_2$  (1,5 mM)
- TdT (5U)
- Biotin-16-dUTP (0,5 nmol)
- DTT (0,1mM)
- $\text{H}_2\text{O}$
- 1/50 Streptavidin-FITC løsning (50  $\mu\text{l}$  per prøve)
  - Streptavidin-FITC (Amersham, UK)
  - 3 % w/v tørrmelk i 0,1 % Triton TX100
- 1/250 Hoechst løsning (500  $\mu\text{l}$  per prøve)
  - 0,1 % Triton TX100
  - Hoechst [33258] 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$  (Sigma-Aldrich, USA)

#### **RT-PCR:**

- GeneElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit inneholder:
  - Lysis Solution
  - 2-Mercaptoethanol (2-ME)
  - Wash Solution 1
  - Wash Solution 2 concentrate
  - Elution Solution
  - GeneElute Filtration Columns in Tubes
  - GeneElute Binding Columns in Tubes

- Collection Tubes, 2. ml
- High Capacity RNA-to-cDNA MasterMix (Applied Biosystems)
- TaqMan Gene Expression MasterMix (Applied Biosystems)
- Genprober
  - SCD Hs01682761 (Applied BioSystems)
  - SREBP1 Hs01088691 (Applied BioSystems)
  - ITGA2 Hs00158127 (Applied BioSystems)
  - ITGB1 Hs00559595 (Applied BioSystems)
  - MET Hs 01565584 (Applied BioSystems)
  - GAPDH (Applied BioSystems)
- 7500 Real Time PCR System (Applied BioSystems)

**In vitro klonal analyse:**

- Krystalfiolettoppløsning 5 % (fortynnet til 0.05 %) (Apotekproduksjon)
- Gerber Instruments

**Antistoffer:**

Markør	Primær antistoff	Sekundær antistoff	Bløkkering
PARP (Santa Cruz Biotechnology)  PARP89(CellSignaling)  PARP (CellSignaling)	1:2000	1:2000 antikanin  (Dako, Denmark)	5 % tørrmelk i TBST



P-eIF2 $\alpha$ (CellSignaling)	1:1000	1:2000 (Dako, Denmark)	5 % BSA i TBST
Mcl-1 (Santa Cruz Biotechnology)	2:1000	1:5000 (Dako, Denmark)	5 % tørrmelk i TBST
$\alpha$ -tubulin (CellSignaling)	1:10 000	1: 10 000 (Dako, Denmark)	5 % tørrmelk i TBST